การผลิตวัคซีนจากเชื้อ *Vibrio harveyi* และการประยุกต์ใช้ในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius)

Production of Vaccine from *Vibrio harveyi* and Its Application in Black Tiger Prawn (*Penaeus monodon* Fabricius)

สาวิตรี ศิลาเกษ

Sawitri Silakes

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Aquatic Science
Prince of Songkla University

2541

เลขหมู่ QK 911.5.B32 A65 3921 ฉ.2
Bib Key 142901

ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตวัคซีนจากเชื้อ *Vibrio harveyi* และการประยุกต์ใช้ในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius)

ผู้เขียน นางสาวสาวิตรี ศิลาเกษ

สาขาวิชา วาริชศาสตร์

คณะกรรมการที่ปรึกษา

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.กิจการ ศุภมาตย์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โชคชัย วนภู)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.กิจการ ศุภมาตย์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โชคชัย วนภู)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วุฒิพร พรหมขุนทอง)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร อุทารพันธุ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ก้าน จันทร์พรหมมา)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	การผลิตวัคซีนจากเชื้อ *Vibrio harveyi* และการประยุกต์ใช้ในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius)
ผู้เขียน	นางสาวสาวิตรี ศิลาเกษ
สาขาวิชา	วาริชศาสตร์
ปีการศึกษา	2540

บทคัดย่อ

เชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* แยกได้จากกุ้งกุลาดำที่ป่วยเป็นโรคเรืองแสง นำมาทดสอบเพื่อยืนยันชนิดของเชื้อโดยใช้คุณสมบัติทางชีวเคมี และทำการผลิตวัคซีนจากเชื้อที่ได้โดยเลี้ยงในอาหารเหลว (Tryptic Soy Broth) บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นรวบรวมเชื้อแล้วนำมาทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง ตรวจสอบความปลอดเชื้อของวัคซีนและนำไปทำการแช่แข็งแห้งเพื่อทำเป็นวัคซีนผง นำวัคซีนที่ผลิตได้มาให้แก่กุ้งกุลาดำ 3 วิธีคือ วิธีกิน วิธีแช่และวิธีฉีด จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างเลือดกุ้งในวันที่ 10, 20 และ 30 วันหลังจากเริ่มให้วัคซีน โดยทำการตรวจสอบพารามิเตอร์ 4 อย่างคือ แอคทิวิตี้ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ปริมาณการผลิตซูเปอร์ออกไซด์แอนอิออน ค่าความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือด และการทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ *V. harveyi* การให้วัคซีนด้วยวิธีกินทำโดยผสมวัคซีนลงในอาหาร 4 ระดับคือ 0, 0.1, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักอาหาร การให้วัคซีนด้วยวิธีแช่ทำโดยเตรียมสารละลายวัคซีนเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) และนำวัคซีนมาเจือจางกับน้ำทะเลในอัตราส่วน 1:250 จากนั้นแช่กุ้งกุลาดำเป็นเวลา 5 ชั่วโมงและหลังจากแช่วัคซีนครั้งแรก 14 วันจึงทำการแช่วัคซีนในระดับความเข้มข้นเดิมอีกครั้ง ส่วนวิธีการให้วัคซีนด้วยวิธีฉีดทำโดยฉีดสารละลายวัคซีนเข้มข้น 2 ระดับคือ 0.1 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยจะฉีดเข้าไปที่บริเวณกล้ามเนื้อท้องปล้องที่ 6 ในปริมาณตัวละ 0.1 มิลลิลิตร

การให้วัคซีนด้วยวิธีการให้กินและวิธีการแช่สามารถกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งที่ได้รับวัคซีนให้เพิ่มมากขึ้นได้เช่น ความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำ

เลือด และความต้านทานต่อเชื้อ *V. harveyi* แต่ พบว่า RPS (relative percent survival) ของการให้วัคซีนด้วยวิธีการให้กินและวิธีการแช่มีค่าต่ำกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีการให้กินและวิธีการแช่วัคซีนมีประสิทธิภาพต่ำในการป้องกันการติดเชื้อ *V. harveyi* ในกุ้งกุลาดำ นอกจากนี้ยังพบว่าการให้วัคซีนด้วยวิธีการกินไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่างการผสมวัคซีนลงในอาหารที่ระดับ 0.1, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการให้วัคซีนด้วยวิธีการฉีดพบว่าเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสามารถเพิ่มการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น เช่น ปริมาณการผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน ความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือด และความต้านทานต่อเชื้อ *V. harveyi* มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นโดยพบว่าค่า RPS ของการให้วัคซีนด้วยวิธีฉีดที่ระดับความเข้มข้น 0.1 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์มีค่ามากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่างการให้วัคซีนเข้มข้น 0.1 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าการให้วัคซีนด้วยวิธีฉีดเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ดีที่สุด ส่วนวิธีการให้กินและวิธีแช่มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในระดับที่ใกล้เคียงกัน

Thesis Title	Production of Vaccine from *Vibrio harveyi* and Its Application in Black Tiger Prawn (*Penaeus monodon* Fabricius)
Author	Miss Sawitri Silakes
Major Program	Aquatic Science
Academic Year	1997

Abstract

The luminescent bacterium *Vibrio harveyi* was isolated from infected black tiger prawns and identified biochemically. The bacterium was incubated at room temperature for 24 hours in Tryptic Soy Broth. The cells were then killed by ultrasonic homoginization. The sterility of the vaccine was confirmed by culturing on Tryptic Soy Agar. The vaccine was then lyophilized and preserved dry.

The vaccine was administered to the black tiger prawns using three methods; oral, immersion and injection. Blood was collected from black tiger prawns at 10, 20 and 30 days post vaccination. It was analyzed for phenoloxidase activity, superoxide anion production, bacterial clearance from haemolymph and disease resistance against *V. harveyi*. Oral administration was with the dry vaccine mixed with feed at 0, 0.1, 0.5 and 1 % of the total weight of the feed. The immersion solution was prepared by diluting 2.5% vaccine solution to 1:250 (vaccine : seawater). Prawns were immersed in the dilute solution for five hours. The treatment was repeated 14 days after the first immersion. For injection, prawns were injected intramuscularly with 0.1 ml of 0.1 or 0.25% of the vaccine solution in sixth abdominal segment.

These methods produced positive results in clearing bacteria from the haemolymph, and in disease resistance against *V. harveyi*. The overall survival

(RPS) was less than 60%, leading to the conclusion that vaccine administered by either oral or immersion methods has a low protection factor for black tiger prawn. In the oral trial, there was no significant differences among the 0.1, 0.5 and 1% vaccine added to the feed.

However, vaccine administered by injection show markedly high protection against disease. It enhanced the activities in the immune response such as production of superoxide anion, clearance of bacteria from the haemolymph and in disease resistance. There was overall 60% RPS in the 0.1 and 0.25% vaccine solution trials, with no significant differences between the two.

It was therefore concluded that the injection method was superior to the oral or immersion methods.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.กิจการ ศุภมาตย์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาที่กรุณาให้คำแนะนำ คำปรึกษาตลอดในการทำวิจัย การค้นคว้าและการเขียนวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โชคชัย วนภู กรรมการที่ปรึกษาร่วมที่คอยให้คำแนะนำต่างๆ และช่วยตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ ขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วุฒิพร พรหมขุนทอง กรรมการผู้แทนจากภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ และ รองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร อุทารพันธุ์ กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัยที่กรุณาให้คำแนะนำและช่วยตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และขอบคุณพี่น้องศิลาเกษทุกคนที่ให้กำลังใจที่สำคัญยิ่งแก่ผู้วิจัย ขอขอบคุณ คุณวันชัย เพชรตะกั่ว ที่ให้ความช่วยเหลือในการจัดหากุ้งทดลองและเป็นกำลังใจให้ตลอดมา

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุติมา ตันติกิตติ ที่คอยให้คำแนะนำต่างๆ ในการศึกษา ขอบคุณ คุณจันทร์จิรา จอมสวัสดิ์ เจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำทุกท่าน คุณสุภฎา คีรีรัฐนิคม คุณจักรพงษ์ ศรีพนมยม และ คุณชุตินุช สุจริต ที่ให้ความช่วยเหลือต่างๆในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่ให้ทุนอุดหนุนการศึกษา ขอขอบพระคุณศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติและบัณฑิตวิทยาลัยที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยครั้งนี้ คุณประโยชน์ที่เกิดจากงานวิจัยนี้ขอมอบแด่ บิดา มารดา คณาจารย์ และ ผู้มีพระคุณทุกท่าน

สาวิตรี ศิลาเกษ

สารบาญ

หน้า

บทคัดย่อ.....(3)
Abstract.....(5)
กิตติกรรมประกาศ.....(7)
สารบาญ.....(8)
รายการตาราง.....(9)
รายการภาพ.....(20)
บทที่
1. บทนำ.....1
บทนำต้นเรื่อง.....1
ตรวจเอกสาร.....3
วัตถุประสงค์.....30
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ.....31
วัสดุ.....31
อุปกรณ์.....32
วิธีการ.....32
3. ผล.....37
4. วิจารณ์.....61
5. สรุป.....72
เอกสารอ้างอิง.....73
ภาคผนวก.....82
ประวัติผู้เขียน.....159

รายการตาราง

ตารางที่ หน้า

1. ลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ *V. harveyi*....8
2. ลักษณะของเม็ดเลือดทั้ง 3 ชนิดที่ใช้เป็นเกณฑ์ในการแยกชนิดของเม็ดเลือด....16
3. ลักษณะ คุณสมบัติ และหน้าที่ของเซลล์เม็ดเลือดแต่ละชนิด....17
4. ผลทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อที่แยกจากกุ้งที่ป่วยเป็นโรคเรืองแสง....38
5. ความไวต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆของเชื้อ *V. harveyi* ที่แยกจากกุ้งเป็นโรคเรืองแสง....39
6. เปรียบเทียบค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (PO activity) ในเม็ดเลือดของกุ้งที่กินอาหารผสมวัคซีน 4 ระดับคือ 0, 0.1, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักอาหาร....42
7. เปรียบเทียบปริมาณการผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน (SO anion) ในเม็ดเลือดของกุ้งที่กินอาหารผสมวัคซีน 4 ระดับคือ 0, 0.1, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักอาหาร....43
8. เปรียบเทียบค่าความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือดบนอาหาร PCA ของกุ้งที่กินอาหารผสมวัคซีน 4 ระดับคือ 0, 0.1, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักอาหารอาหาร....43
9. เปรียบเทียบค่าความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือดบนอาหาร TCBS ของกุ้งที่กินอาหารผสมวัคซีน 4 ระดับคือ 0, 0.1, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักอาหาร....44
10 เปรียบเทียบค่าประสิทธิภาพของวัคซีน (RPS) ของกุ้งที่กินอาหารผสมวัคซีน 4 ระดับคือ 0, 0.1, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักอาหาร....44
11. เปรียบเทียบค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (PO activity) ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีแช่โดยใช้วัคซีนเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์....48

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

12. เปรียบเทียบปริมาณการผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน (SO anion) ในเม็ดเลือด ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีแช่โดยใช้วัคซีนเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์.....48
13. เปรียบเทียบค่าความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือดบนอาหาร PCA ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีแช่โดยใช้วัคซีนเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์.....49
14. เปรียบเทียบค่าความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือดบนอาหาร TCBS ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีแช่โดยใช้วัคซีนเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์.....49
15. เปรียบเทียบค่าประสิทธิภาพของวัคซีน (RPS)ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีแช่ โดยใช้วัคซีนเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์.....50
16. เปรียบเทียบค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (PO activity) ในเม็ดเลือด ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีฉีดโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.1 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกลุ่มควบคุมฉีดน้ำเกลือปลอดเชื้อเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์.....55
17. เปรียบเทียบปริมาณการผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน (SO anion) ในเม็ดเลือด ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีฉีดโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.1 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกลุ่ม ควบคุมฉีดน้ำเกลือปลอดเชื้อเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์.....55
18. เปรียบเทียบค่าความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือดบนอาหาร PCA ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีฉีดโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.1 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ ส่วน กลุ่มควบคุมฉีดน้ำเกลือปลอดเชื้อเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์.....56
19. เปรียบเทียบค่าความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือดบนอาหาร TCBS ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีฉีดโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.1 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ ส่วน กลุ่มควบคุมฉีดน้ำเกลือปลอดเชื้อเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์.....56
20. เปรียบเทียบค่าประสิทธิภาพของวัคซีน (RPS) ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีฉีด โดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.1 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ 57

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่ หน้า

ก1 สูตรอาหารผสมวัคซีน 4 ระดับคือ 0, 0.1, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์.....83

ค1 การวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหา LD_{50} ที่ 14 วัน ตามวิธีของ Reed และ Muench (1938).....89

ค2 การหา standard curve ระหว่างค่า absorbance และจำนวน cell/ml (lny).....92

ค3 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองกลุ่มที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกิน โดยผสมวัคซีนในอาหาร 0 % ภายหลังจากได้รับอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 10 วัน.....93

ค4 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองกลุ่มที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกิน โดยผสมวัคซีนในอาหาร 0.1 % ภายหลังจากได้รับอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 10 วัน.....93

ค5 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองกลุ่มที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกิน โดยผสมวัคซีนในอาหาร 0.5 % ภายหลังจากได้รับอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 10 วัน.....94

ค6 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองกลุ่มที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกิน โดยผสมวัคซีนในอาหาร 1 % ภายหลังจากได้รับอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 10 วัน.....94

ค7 ปริมาณ SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองกลุ่มที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0%หลังจากได้รับอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 10 วัน.....95

ค8 ปริมาณ SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองกลุ่มที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0.1%หลังจากได้รับอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 10 วัน.....95

ค9 ปริมาณ SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองกลุ่มที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0.5%หลังจากได้รับอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 10 วัน.....96

ค10 ปริมาณ SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองกลุ่มที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 1%หลังจากได้รับอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 10 วัน.....96

ค11 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกิน โดยผสมวัคซีนในอาหาร 0%หลังจากกินอาหารผสมวัคซีน 10 วัน 97

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่ หน้า

ค12 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกิน โดยผสมวัคซีนในอาหาร 0.1%หลังจากกินอาหารผสมวัคซีน10 วัน.....97
ค13 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกิน โดยผสมวัคซีนในอาหาร 0.5%หลังจากกินอาหารผสมวัคซีน10 วัน.....98
ค14 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกิน โดยผสมวัคซีนในอาหาร 1%หลังจากกินอาหารผสมวัคซีน10 วัน.....98
ค15 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBS ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกิน โดยผสมวัคซีนในอาหาร 0%หลังจากกินอาหารผสมวัคซีน10 วัน.....99
ค16 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBS ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกิน โดยผสมวัคซีนในอาหาร 0.1%หลังจากกินอาหารผสมวัคซีน10 วัน.....99
ค17 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBS ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกิน โดยผสมวัคซีนในอาหาร 0.5%หลังจากกินอาหารผสมวัคซีน10 วัน.....100
ค18 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBS ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกิน โดยผสมวัคซีนในอาหาร 1%หลังจากกินอาหารผสมวัคซีน10 วัน.....100
ค19 จำนวนกุ้งที่ตายภายหลังการฉีดเชื้อ *V. harveyi*.....101
ค20 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองกลุ่มที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกิน โดยผสมวัคซีนในอาหาร 0 % ภายหลังจากได้รับอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 20 วัน.....102
ค21 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองกลุ่มที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกิน โดยผสมวัคซีนในอาหาร 0.1 % ภายหลังจากได้รับอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 20 วัน...102
ค22 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองกลุ่มที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกิน โดยผสมวัคซีนในอาหาร 0.5 % ภายหลังจากได้รับอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 20 วัน..103
ค23 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองกลุ่มที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกิน โดยผสมวัคซีนในอาหาร 1 % ภายหลังจากได้รับอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 20 วัน.....103

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่ หน้า

ค24 ปริมาณ SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองกลุ่มที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0%หลังจากได้รับอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 20 วัน.....104

ค25 ปริมาณ SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองกลุ่มที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0.1%หลังจากได้รับอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 20 วัน.....104

ค26 ปริมาณ SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองกลุ่มที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0.5%หลังจากได้รับอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 20 วัน.....105

ค27 ปริมาณ SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองกลุ่มที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 1%หลังจากได้รับอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 20 วัน.....105

ค28 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0%หลังจากกินอาหารผสมวัคซีน 20 วัน.....106

ค29 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0.1%หลังจากกินอาหารผสมวัคซีน 20 วัน.....106

ค30 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0.5%หลังจากกินอาหารผสมวัคซีน 20 วัน.....107

ค31 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 1%หลังจากกินอาหารผสมวัคซีน 20 วัน 107

ค32 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBS ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0%หลังจากกินอาหารผสมวัคซีน 20 วัน.....108

ค33 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBS ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0.1%หลังจากกินอาหารผสมวัคซีน 20 วัน.....108

ค34 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBS ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0.5%หลังจากกินอาหารผสมวัคซีน 20 วัน.....109

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่ หน้า

ค35 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBS ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกิน โดยผสมวัคซีนในอาหาร 1%หลังจากกินอาหารผสมวัคซีน 20 วัน.....109
ค36 จำนวนกุ้งที่ตายภายหลังการฉีดเชื้อ *V. harveyi* 110
ค37 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองกลุ่มที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกิน โดยผสมวัคซีนในอาหาร 0 % ภายหลังจากได้รับอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 30 วัน.....111
ค38 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองกลุ่มที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกิน โดยผสมวัคซีนในอาหาร 0.1 % ภายหลังจากได้รับอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 30 วัน.....111
ค39 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองกลุ่มที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกิน โดยผสมวัคซีนในอาหาร 0.5 % ภายหลังจากได้รับอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 30 วัน.....112
ค40 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองกลุ่มที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกิน โดยผสมวัคซีนในอาหาร 1 % ภายหลังจากได้รับอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 30 วัน.....112
ค41 ปริมาณ SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองกลุ่มที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0%หลังจากได้รับอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 30 วัน.....113
ค42 ปริมาณ SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองกลุ่มที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0.1%หลังจากได้รับอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 30 วัน.....113
ค43 ปริมาณ SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองกลุ่มที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0.5%หลังจากได้รับอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 30 วัน.....114
ค44 ปริมาณ SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองกลุ่มที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 1%หลังจากได้รับอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 30 วัน.....114
ค45 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกิน โดยผสมวัคซีนในอาหาร 0%หลังจากกินอาหารผสมวัคซีน 30 วัน.....115
ค46 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกิน โดยผสมวัคซีนในอาหาร 0.1%หลังจากกินอาหารผสมวัคซีน 30 วัน.....115

ตารางภาคผนวกที่ หน้า

ค47 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกิน โดยผสมวัคซีนในอาหาร 0.5%หลังจากกินอาหารผสมวัคซีน 30 วัน 116
ค48 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกิน โดยผสมวัคซีนในอาหาร 1%หลังจากกินอาหารผสมวัคซีน 30 วัน.....116
ค49 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBS ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกิน โดยผสมวัคซีนในอาหาร 0%หลังจากกินอาหารผสมวัคซีน 30 วัน.....117
ค50 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBS ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกิน โดยผสมวัคซีนในอาหาร 0.1%หลังจากกินอาหารผสมวัคซีน 30 วัน.....117
ค51 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBS ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกิน โดยผสมวัคซีนในอาหาร 0.5%หลังจากกินอาหารผสมวัคซีน 30 วัน.....118
ค52 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBS ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกิน โดยผสมวัคซีนในอาหาร 1%หลังจากกินอาหารผสมวัคซีน 30 วัน.....118
ค53 จำนวนกุ้งที่ตายภายหลังการฉีดเชื้อ *V. harveyi*.....119
ค54 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองกลุ่มที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการแช่ภาย หลังจากได้รับวัคซีนเป็นเวลา 10 วันโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 2.5 %.....120
ค55 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน(กลุ่มควบคุม) หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน.....120
ค56 ค่า SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองกลุ่มที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการแช่ภาย หลังจากได้รับวัคซีนเป็นเวลา 10 วันโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 2.5 %.....121
ค57 ค่า SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน(กลุ่มควบคุม) หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน.....121
ค58 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีแช่ โดยใช้วัคซีนเข้มข้น 2.5%ภายหลังจากแช่อาหารผสมวัคซีน 10 วัน.....122

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่ หน้า

ค59 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งทดลองกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน(กลุ่มควบคุม)หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน.....122
ค60 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBS ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีแช่โดยใช้วัคซีนเข้มข้น 2.5%ภายหลังจากแช่อาหารผสมวัคซีน 10 วัน.....123
ค61 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBS ของกุ้งทดลองกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน(กลุ่มควบคุม)หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน.....123
ค62 จำนวนกุ้งที่ตายภายหลังการฉีดเชื้อ *V. harveyi*.....124
ค63 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองกลุ่มที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการแช่ภายหลังจากได้รับวัคซีนเป็นเวลา 20 วันโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 2.5 %.....125
ค64 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน(กลุ่มควบคุม)หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน.....125
ค65 ค่า SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองกลุ่มที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการแช่ภายหลังจากได้รับวัคซีนเป็นเวลา 20 วันโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 2.5 %.....126
ค66 ค่า SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน(กลุ่มควบคุม)หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน.....126
ค67 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีแช่โดยใช้วัคซีนเข้มข้น 2.5%ภายหลังจากแช่อาหารผสมวัคซีน 20 วัน.....127
ค68 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งทดลองกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน(กลุ่มควบคุม)หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน.....127
ค69 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBS ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีแช่โดยใช้วัคซีนเข้มข้น 2.5%ภายหลังจากแช่อาหารผสมวัคซีน 20 วัน.....128
ค70 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBS ของกุ้งทดลองกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน(กลุ่มควบคุม)หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน.....128

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่ หน้า

ค71 จำนวนกุ้งที่ตายภายหลังการฉีดเชื้อ *V. harveyi*.....129
ค72 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองกลุ่มที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการแช่ภายหลังจากได้รับวัคซีนเป็นเวลา 30 วันโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 2.5 %.....130
ค73 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน(กลุ่มควบคุม)หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน.....130
ค74 ค่า SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองกลุ่มที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการแช่ภายหลังจากได้รับวัคซีนเป็นเวลา 30 วันโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 2.5 %.....131
ค75 ค่า SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน(กลุ่มควบคุม)หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน.....131
ค76 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีแช่โดยใช้วัคซีนเข้มข้น 2.5%ภายหลังจากแช่อาหารผสมวัคซีน 30 วัน.....132
ค77 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งทดลองกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน(กลุ่มควบคุม)หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน.....132
ค78 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBS ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีแช่โดยใช้วัคซีนเข้มข้น 2.5%ภายหลังจากแช่อาหารผสมวัคซีน 30 วัน.....133
ค79 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBS ของกุ้งทดลองกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน(กลุ่มควบคุม)หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน.....133
ค80 จำนวนกุ้งที่ตายภายหลังการฉีดเชื้อ *V. harveyi*.....134
ค81 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการฉีดภายหลังจากได้รับวัคซีนเป็นเวลา 10 วันโดยฉีดวัคซีนเข้มข้น 0.1 %.....135
ค82 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการฉีดภายหลังจากได้รับวัคซีนเป็นเวลา 10 วันโดยฉีดวัคซีนเข้มข้น 0.25 %.....135

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่ หน้า

ค83 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน(กลุ่มควบคุม) หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน....136
ค84 ค่า SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการฉีดภาย หลังจากได้รับวัคซีนเป็นเวลา 10 วันโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.1 %....136
ค85 ค่า SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการฉีดภาย หลังจากได้รับวัคซีนเป็นเวลา 10 วันโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.25 %....137
ค86 ค่า SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน(กลุ่มควบคุม) หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน....137
ค87 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีฉีด โดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.1%ภายหลังจากได้รับวัคซีน 10วัน....138
ค88 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีฉีด โดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.25%ภายหลังจากได้รับวัคซีน 10วัน 139
ค89 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งทดลองกลุ่มที่ไม่ได้รับ วัคซีน(กลุ่มควบคุม)หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน....139
ค90 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBS ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีฉีด โดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.1%ภายหลังจากได้รับวัคซีน 10วัน....140
ค91 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBS ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีฉีด โดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.25%ภายหลังจากได้รับวัคซีน 10วัน....140
ค92 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBS ของกุ้งทดลองกลุ่มที่ไม่ได้รับ วัคซีน(กลุ่มควบคุม)หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน....141
ค93 จำนวนกุ้งที่ตายภายหลังการฉีดเชื้อ *V. harveyi*....142
ค94 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการฉีดภาย หลังจากได้รับวัคซีนเป็นเวลา 20 วันโดยฉีดวัคซีนเข้มข้น 0.1 %....143

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่ หน้า

ค95 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการฉีด ภายหลังจากได้รับวัคซีนเป็นเวลา 20 วันโดยฉีดวัคซีนเข้มข้น 0.25 %.....143
ค96 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน(กลุ่มควบคุม) หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน.....144
ค97 ค่า SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการฉีดภาย หลังจากได้รับวัคซีนเป็นเวลา 20 วันโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.1 %.....144
ค98 ค่า SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการฉีดภาย หลังจากได้รับวัคซีนเป็นเวลา 20 วันโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.25 %.....145
ค99 ค่า SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน(กลุ่มควบคุม) หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน.....145
ค100 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีฉีด โดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.1%ภายหลังจากได้รับวัคซีน 20 วัน.....146
ค101 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีฉีด โดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.25%ภายหลังจากได้รับวัคซีน 20 วัน.....147
ค102 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งทดลองกลุ่มที่ไม่ได้รับ วัคซีน(กลุ่มควบคุม)หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน.....147
ค103 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBS ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีฉีด โดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.1%ภายหลังจากได้รับวัคซีน 20 วัน.....148
ค104 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBS ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีฉีด โดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.25%ภายหลังจากได้รับวัคซีน 20 วัน.....148
ค105 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBS ของกุ้งทดลองกลุ่มที่ไม่ได้รับ วัคซีน(กลุ่มควบคุม)หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน.....149
ค106 จำนวนกุ้งที่ตายภายหลังการฉีดเชื้อ *V. harveyi*.....150

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่ หน้า

ค107 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการฉีดภาย หลังจากได้รับวัคซีนเป็นเวลา 30 วันโดยฉีดวัคซีนเข้มข้น 0.1 %.....151
ค108 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการฉีดภาย หลังจากได้รับวัคซีนเป็นเวลา 30 วันโดยฉีดวัคซีนเข้มข้น 0.25 %.....151
ค109 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน(กลุ่มควบคุม) หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน.....152
ค110 ค่า SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการฉีดภาย หลังจากได้รับวัคซีนเป็นเวลา 30 วันโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.1 %.....152
ค111 ค่า SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการฉีดภายหลัง จากได้รับวัคซีนเป็นเวลา 30 วันโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.25 %.....153
ค112 ค่า SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งทดลองกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน(กลุ่มควบคุม) หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน.....153
ค113 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีฉีด โดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.1%ภายหลังจากได้รับวัคซีน 30วัน.....154
ค114 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีฉีด โดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.25%ภายหลังจากได้รับวัคซีน 30วัน.....155
ค115 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งทดลองกลุ่มที่ไม่ได้รับ วัคซีน(กลุ่มควบคุม)หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน.....155
ค116 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBS ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีฉีด โดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.1%ภายหลังจากได้รับวัคซีน 30วัน.....156
ค117 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBS ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีฉีด โดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.25%ภายหลังจากได้รับวัคซีน 30วัน.....156

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่ หน้า

ค118 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBS ของกุ้งทดลองกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน(กลุ่มควบคุม)หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน.....157

ค119 จำนวนกุ้งที่ตายภายหลังการฉีดเชื้อ *V. harveyi*.....158

รายการภาพ

ภาพที่ หน้า

1. ไดอะแกรมแสดงโครงสร้างของแบคทีเรีย....10
2. โครงสร้างของเพปทิโดกลัยแคน....12
3. ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ....13
4. การเกิดเอนแคปซูเลชันในการกำจัดปรสิตของเซลล์เม็ดเลือดภายหลังจากการติดเชื้อปรสิต 12-24 ชั่วโมง....19
5. การเกิดเอนแคปซูเลชันในการกำจัดปรสิตของเซลล์เม็ดเลือดภายหลังจากการติดเชื้อปรสิต 48 ชั่วโมง....20
6. การเกิดเอนแคปซูเลชันในการกำจัดปรสิตของเซลล์เม็ดเลือดภายหลังจากการติดเชื้อปรสิต 72 ชั่วโมง....21
7. กระบวนการในระบบโปรพีโอ....24
8. กระบวนการในระบบโปรพีโอ....25
9. กระบวนการในระบบโปรพีโอ....26
10. วัคซีนเชื้อเรืองแสงที่ได้จากการทำให้เซลล์แตกแล้วทำการแช่แข็งแห้ง....40
11. เปรียบเทียบปริมาณการผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออนในเม็ดเลือดของกุ้งที่กินอาหารผสมวัคซีนเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ โดยวิเคราะห์วันที่ 10, 20 และ 30 วันหลังจากเริ่มให้วัคซีน....45
12. เปรียบเทียบค่าความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือดบนอาหาร PCA ของกุ้งที่กินอาหารผสมวัคซีนเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ โดยวิเคราะห์วันที่ 10, 20 และ 30 วันหลังจากเริ่มให้วัคซีน....45
13. เปรียบเทียบค่าความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือดบนอาหาร TCBS ของกุ้งที่กินอาหารผสมวัคซีนเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ โดยวิเคราะห์วันที่ 10, 20 และ 30 วันหลังจากเริ่มให้วัคซีน....46

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

14. เปรียบเทียบค่าประสิทธิภาพของวัคซีน (RPS) ของกุ้งที่กินอาหารผสมวัคซีนเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ โดยวิเคราะห์วันที่ 10, 20 และ 30 วันหลังจากเริ่มให้วัคซีน.....46
15. เปรียบเทียบค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (PO activity) ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีแช่โดยใช้วัคซีนเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์.....51
16. เปรียบเทียบปริมาณการผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน (SO anion)ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีแช่โดยใช้วัคซีนเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์.....51
17. เปรียบเทียบค่าความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือดบนอาหาร PCA ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์.....52
18. เปรียบเทียบค่าความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือดบนอาหาร TCBS ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์.....52
19. เปรียบเทียบค่าประสิทธิภาพของวัคซีน (RPS) ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีแช่โดยใช้วัคซีนเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์.....53
20. เปรียบเทียบค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (PO activity) ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีฉีดโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.1 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกลุ่มควบคุมฉีดน้ำเกลือปลอดเชื้อเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์.....58
21. เปรียบเทียบปริมาณการผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน (SO anion) ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีฉีดโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.1 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกลุ่มควบคุมฉีดน้ำเกลือปลอดเชื้อเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์.....58
22. เปรียบเทียบค่าความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือดบนอาหาร PCA ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีฉีดโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.1 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกลุ่มควบคุมฉีดน้ำเกลือปลอดเชื้อเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์.....59

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

23. เปรียบเทียบค่าความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือดบนอาหาร TCBS ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีฉีดโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.1 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกลุ่มควบคุมฉีดน้ำเกลือปลอดเชื้อเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์.....59
24. เปรียบเทียบค่าประสิทธิภาพของวัคซีน (RPS) ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีฉีด โดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.1 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์.....60

ภาพผนวกที่

ค1 standard curve ระหว่างค่า absorbance และจำนวน cell/ml (lny).....91

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศไทยในปัจจุบันสามารถทำรายได้ให้แก่ประเทศมูลค่าปีละหลายหมื่นล้านบาท (ฝ่ายสถิติและสารสนเทศการประมง, 2538) เนื่องจากประเทศไทยได้มีการพัฒนาเทคนิควิธีการเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์สัตว์น้ำชนิดต่างๆ จนประสบความสำเร็จและทำให้เกิดการขยายตัวเพิ่มพื้นที่ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่มีค่าทางเศรษฐกิจและรวมไปถึงการเลี้ยงโดยปล่อยสัตว์น้ำหนาแน่นขึ้น เช่นการเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่มีการเพิ่มพื้นที่เลี้ยงกระจายออกไปตามชายทะเลและเลี้ยงโดยปล่อยกุ้งในอัตราที่หนาแน่นมาก ในระบบการเลี้ยงที่หนาแน่นปัญหาที่หลีกเลี่ยงได้ยากคือโรคติดเชื้อในกุ้ง (infectious diseases) ซึ่งทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจเป็นมูลค่าหลายล้านบาทต่อปี การจัดการในการเลี้ยงที่ผิดวิธีส่งผลให้กุ้งเกิดความเครียด เช่น ในเรื่องสภาพพื้นก้นบ่อ คุณภาพของน้ำ การให้อาหารรวมถึงการใช้สารเคมีที่ผิดวิธี เมื่อกุ้งเกิดอาการเครียดเชื้อโรคที่มีอยู่แล้วในธรรมชาติจะทำให้เกิดการติดเชื้อในกุ้ง เนื่องจากสภาพที่กุ้งเครียดร่างกายอ่อนแอทำให้ระบบภูมิคุ้มกันโรคจะลดต่ำลงหรือบกพร่องไม่มีประสิทธิภาพ ส่งผลให้กุ้งแสดงอาการของโรคและทำให้อัตราการรอดตายลดต่ำลง โรคที่เกิดในบ่อเลี้ยงกุ้งและโรงเพาะฟักโดยทั่วไปเกิดจากสิ่งมีชีวิต 4 กลุ่มใหญ่ๆ คือ ปรสิต เชื้อรา ไวรัส และแบคทีเรีย เชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคของกุ้งมีหลายชนิด เชื้อสำคัญที่ทำความเสียหายให้แก่การเพาะเลี้ยงกุ้งคือ เชื้อ *Vibrio harveyi* โดยกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้จะเป็นโรคเรืองแสง พบการติดเชื้อดังกล่าวทั้งในโรงเพาะฟักและบ่อเลี้ยง ถ้าโรคนี้เกิดขึ้นกับลูกกุ้งวัยอ่อนจะทำให้ลูกกุ้งตายเป็นจำนวนมาก นับเป็นการสูญเสียทางเศรษฐกิจที่สำคัญ (มณเฑียร ส่งเสริม และคณะ, 2533) ปัจจุบันวิธีที่ใช้ในการแก้ปัญหาการติดเชื้อโรคของกุ้งโดยทั่วไปจะเน้นไปที่การใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะ แต่เนื่องจากความรู้ความเข้าใจในเรื่องการใช้ยาและสารเคมียังส่งเสริมไปไม่ทั่วถึง รวมถึงการใช้ยาที่ไม่ได้มาตรฐานและการใช้สารเคมีที่ไม่สมควรนำมาใช้ ซึ่งนอกจากจะไม่ได้ผลแล้วยังทำให้เกิดปัญหาเรื่องยาตกค้างในธรรมชาติ และยาตกค้างในเนื้อกุ้ง (drug

residue) เนื่องจากไม่มีการหยุดยาให้นานเพียงพอก่อนจะจับกุ้งขาย ซึ่งปัญหานี้ทำให้กุ้งราคาตกหรือขายไม่ได้ การใช้ยาปฏิชีวนะส่วนใหญ่จะใช้พวกออกซี่เตตร้าซัยคลิน (oxytetracycline) หรือพวกออกโซลินิก แอซิด (oxolinic acid) ฟลูมิควิน (flumequine) เพนนิซิลลิน (pennicillin) ซัลฟาไตรเมโธพริม (sulfatrimethoprim) ฯ ซึ่งถ้าหากมีวิธีการให้ยาเหล่านี้ไม่ถูกต้องนอกจะรักษาโรคไม่หายแล้ว ยังทำให้เชื้อโรคเกิดการดื้อยา ไม่สามารถกำจัดได้ด้วยยาชนิดเดิมอีกต่อไป จึงต้องใช้ยาที่มีฤทธิ์รุนแรงมากขึ้น และหากยังมีการใช้ยาที่ไม่ถูกต้องอีกก็จะทำให้เชื้อโรคนั้นพัฒนาตัวเพื่อต่อต้านยาชนิดใหม่ ทำให้รักษาโรคได้ยากมากขึ้น จึงได้มีการศึกษาแนวทางใหม่ในการป้องกันการเกิดโรคในกุ้ง คือ การใช้วัคซีน ซึ่งในสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังเช่นกุ้งยังไม่มีข้อมูลที่ชัดเจนถึงการตอบสนองต่อวัคซีนที่ใช้เนื่องมาจากระบบภูมิคุ้มกันแตกต่างกับสัตว์มีกระดูกสันหลัง ในการศึกษาครั้งนี้ต้องการดูผลของวัคซีนที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* โดยศึกษาถึงวิธีการผลิตวัคซีนจากเชื้อแบคทีเรียและวิธีการที่เหมาะสมในการนำวัคซีนที่ผลิตได้ไปใช้ในกุ้งกุลาดำ เพื่อนำไปสู่แนวทางในการป้องกันโรคติดเชื้อแบคทีเรียในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำต่อไปในอนาคต

ตรวจเอกสาร

1. เชื้อ *Vibrio harveyi*

เชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ที่พบในประเทศไทยเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคเรืองแสงในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) (มณเฑียร ส่งเสริม และคณะ, 2533) และในลูกกุ้งแชบ๊วย (*P. merguiensis*) (ดารุณี แซ่อุ่ย และคณะ, 2530) และพบว่าเชื้อชนิดนี้ยังก่อให้เกิดความเสียหายต่อกุ้งในโรงเพาะฟักในประเทศอินโดนีเซีย (Sunaryanto and Mariam, 1986 อ้างโดย Karunasagar *et al.*, 1994) ฟิลิปปินส์ (Lavilla-Pitogo *et al.*, 1990) และไต้หวัน (Chen *et al.*, 1992) โดยเชื้อ *V. harveyi* ก่อให้เกิดความเสียหายต่อลูกกุ้งในโรงเพาะฟักในระยะตัวอ่อน (larvae), หลังตัวอ่อน (postlarvae) (Lightner, 1988) และในกุ้งขนาดใหญ่ที่เลี้ยงอยู่ในบ่อเลี้ยง (Nash *et al.*, 1992 อ้างโดย Jiravanichpaisal *et al.*, 1994) จากการทดลองของ Chen และคณะ (1992) พบว่าปริมาณเชื้อ *V. harveyi* ที่ระดับความเข้มข้น 1.3 x 10^6 cfu/ml จะทำให้เกิดความแตกต่างทางสถิติของอัตราการตายของกุ้งกุลาดำระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมและที่ความเข้มข้น 10^5-10^6 cfu/ml ของเชื้อ *V. harveyi* ที่แยกมาจากลูกกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในตู้ทดลอง พบว่าทำให้เกิดการตายของกุ้ง 100 เปอร์เซ็นต์ (Karunasagar *et al.*, 1994) ส่วนการทดลองของ ดารุณี แซ่อุ่ย และคณะ (2530) พบว่าที่ระดับเชื้อ *V. harveyi* เข้มข้น 10^7 cfu/ml ทำให้ลูกกุ้งแชบ๊วยมีอัตราการตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีอัตราการตายเพียง 60 เปอร์เซ็นต์ จากการแยกเชื้อต่างๆจากกุ้งกุลาดำในระยะลูกกุ้งและกุ้งโต 82 ตัวพบว่ามีเชื้อ *V. harveyi* อยู่ด้วย (Jiravanichpaisal *et al.*, 1995) และจากการแยกชนิดเชื้อสกุล *Vibrio* spp. จากลูกกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในประเทศไทยของ Ruangpan และคณะ (1995b) พบว่าในกุ้งที่ทำการแยกเชื้อมีเชื้อ *V. harveyi* ในตัวกุ้งด้วย โดยศึกษาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีระวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแต่ละชนิด ส่วนในการทดลองของ Le Groumellec และคณะ (1995) ซึ่งได้ทำการแยกเชื้อจากลูกกุ้งในโรงเพาะฟักที่เลี้ยงในประเทศไทยและประเทศเอควาดอร์ และจำแนกชนิดของเชื้อโดยใช้คุณสมบัติทางชีวเคมี พบว่าเป็นเชื้อ *V. harveyi* ที่เป็นสาเหตุให้เกิดการตายจำนวนมากของลูกกุ้งในโรงเพาะฟัก โดยพบว่าสายพันธุ์ของเชื้อ *V. harveyi* ที่พบในประเทศไทยเป็นชนิดที่มีความรุนแรงมากกว่าที่พบในประเทศเอควาดอร์ และจากทดลองตรวจสอบปริมาณเชื้อในน้ำที่เลี้ยงกุ้งอย่างหนาแน่น โดย Ruangpan และคณะ (1995a) พบเชื้อกลุ่ม

Vibrio หลายชนิดซึ่งมีความเข้มข้นของเชื้ออยู่ในระดับ 10^4-10^5 และ 10^3-10^4 cfu/ml แล้วทำการจำแนกชนิดของเชื้อโดยใช้คุณสมบัติทางชีวเคมี 44 อย่าง พบว่ามีเชื้อ *V. harveyi* อยู่ในน้ำที่เลี้ยงกุ้งด้วยเช่นกัน

แบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* เป็นสาเหตุให้เกิดการตายของกุ้งในระดับตั้งแต่ค่อนข้างมากจนถึงระดับตาย 100 เปอร์เซ็นต์ (Lightner, 1993) โดยเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่แยกได้มาจากกุ้งที่เป็นโรคมักจะพบเชื้อ *V. alginolyticus, V. parahaemolyticus, V. splendidus, V. vulnificus, V. damsela* และ *V. harveyi* (Lavilla-Pitogo, 1995) อาการโดยทั่วๆไปของลูกกุ้งที่ติดเชื้อ *Vibrio* จะเกิดการตายของเนื้อเยื่อบริเวณเซลล์ของท่อตับและพบแบคทีเรียอยู่ในบริเวณท่อตับ ต่อจากนั้นจะเกิด แกรนูลโลมาตัส (granulomatous) ล้อมรอบบริเวณท่อตับที่ถูกเชื้อโรคเข้าทำลาย อาการที่พบจากการติดเชื้อที่ตับอ่อน คือ บริเวณท่อตับจะพบเชื้อแบคทีเรียอยู่ ในกรณีที่การติดเชื้อไม่รุนแรงจะพบเชื้อในปริมาณไม่มากนักและเกิดหนองขึ้นในบริเวณที่มีการตายของเซลล์ในท่อตับ และพบการแทรกตัวของเม็ดเลือดที่บริเวณเนื้อเยื่อระหว่างท่อตับ ส่วนในกรณีที่ติดเชื้อรุนแรง จะพบว่ามีแบคทีเรีย *Vibrio* sp.จำนวนมากเข้าบุกรุกทำลายที่บริเวณ tubular lumen ซึ่งมีผลทำให้เกิด hepatopancreatic tubular necrosis ที่บริเวณ basal lamina ของท่อตับที่ถูกเชื้อโรคเข้าทำลาย ในท่อตับที่มีการติดเชื้อมากๆจะมีการโอบล้อมโดยเม็ดเลือด รอบๆ basal lamina ภายในเนื้อเยื่อบริเวณที่มีการติดเชื้อจะแสดงอาการบวมน้ำ แอ่งเลือดมีขนาดใหญ่ เกิดการรวมตัวกันของ eosinophilic granular และ amorphous matter มีการแทรกซึมของเม็ดเลือดทั้งชนิดเซมิแกรนูลาร์เซลล์ (semigranular cell) และ แกรนูลาร์เซลล์ (granular cell) แต่โดยส่วนใหญ่จะเป็นเซมิแกรนูลาร์เซลล์ ที่มีบทบาทในการกำจัดเชื้อโรคที่บุกรุกเข้ามาโดยจะเกิดเป็น granulomatous lesion (Jiravanichpaisal *et al*., 1995)

ส่วนเชื้อ *V. harveyi* เป็นหนึ่งในหลายๆสกุลของ *Vibrio* ที่ก่อให้เกิดการตายอย่างมากในกุ้งโดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะลูกกุ้งที่อยู่ในโรงเพาะฟัก ดารุณี แซ่อุ่ย และคณะ (2530) ศึกษาถึงสาเหตุการตายของลูกกุ้งแซบ๊วยในโรงเพาะฟัก โดยพบว่าการตายของลูกกุ้งมักจะเกิดขึ้นทุกครั้งเมื่อสังเกตเห็นการเรืองแสงช่วงกลางคืนในน้ำทะเลและอยู่ตามซากลูกกุ้งและลูกกุ้งที่มีชีวิต หลังจากทำการแยกเชื้อจากลูกกุ้งที่ตายพบว่ามีสาเหตุมาจากเชื้อ *V. harveyi* มณเฑียร ส่งเสริม และคณะ (2533) พบว่าอาการที่เกิดจากการติดเชื้อ *V. harveyi*

คือ ในระยะแรกๆลูกกุ้งจะมีการเคลื่อนไหวช้าลงลำตัวสีขาวขุ่น และ Karunasagar และคณะ (1994) นำลูกกุ้งที่มีอาการใกล้ตายมาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ามีแบคทีเรียจำนวนมากอยู่ในแอ่งเลือดของลูกกุ้ง จากการศึกษาของ Lavilla-Pitogo และคณะ (1990) พบว่ามีเชื้อ *V. harveyi* อยู่ในแอ่งเลือดประมาณ $8.6x10^4$ cfu/ml และพบเชื้อชนิดนี้อยู่กันอย่างหนาแน่นที่บริเวณทางเดินอาหารและในลูกกุ้งที่มีอาการติดเชื้อมากๆ ลูกกุ้งจะเริ่มหยุดว่ายน้ำเพราะไม่มีแรงในการบีบตัวที่บริเวณ pre-anal ของทางเดินอาหารและจากการตรวจสอบลักษณะของลูกกุ้งที่ติดเชื้อ *V. harveyi* โดยใช้ scanning electron micrograph จะพบเชื้อชนิดนี้อยู่รวมตัวกันที่บริเวณปากและอวัยวะที่ช่วยในการกินและถ้าในกรณีที่มีการติดเชื้อรุนแรง เชื้อแบคทีเรียจะติดแน่นมีลักษณะเป็นแผ่นและเพิ่มจำนวนมากขึ้น แต่ถึงแม้ว่าจะพบแบคทีเรียที่บริเวณภายนอกลำตัวของลูกกุ้งแต่ไม่พบลักษณะที่แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้เจาะเข้าภายในบริเวณเปลือกเพื่อทำลายเนื้อเยื่อภายใน และจากการตัดตามขวางของบริเวณทางเดินอาหาร พบว่ามีเชื้อนี้อยู่ในบริเวณที่มีอนุภาคของอาหารอยู่ เมื่อตัดเนื้อเยื่อบริเวณเหงือกเพื่อนำมาตรวจสอบ พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียจำนวนมากเช่นกัน จึงคาดว่าการติดเชื้อ *V. harveyi* อาจจะสามารถผ่านทางระบบหายใจได้ ส่วนการศึกษาทางด้านพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งที่ติดเชื้อ *V. harveyi* โดย Jiravanichpaisal และคณะ (1994) พบว่าเชื้อแบคทีเรียจะเข้าทำลายที่บริเวณท่อตับและเซลล์ด้านในของท่อตับจะแยกตัวออกจากชั้นของ basal lamina และเกิดการตายของเนื้อเยื่อบริเวณดังกล่าว ที่บริเวณ basal lamina จะมีการสร้างสารประกอบพวก PAS-positive บริเวณ basal lamina ที่มีการติดเชื้อจะมีลักษณะหนาเนื่องจากมี collagenous fibers ที่ถูกสร้างขึ้นมาใหม่และมีเซลล์ที่ภายในมีนิวเคลียสเป็นรูปเกลียวและถูกตรึงอยู่ใน collagenous fibers ท่อตับที่มีการติดเชื้อจะถูกเซลล์เม็ดเลือดโอบล้อมรอบๆ basal lamina ที่มีลักษณะหนา เนื้อเยื่อที่อยู่ในบริเวณท่อตับที่มีการติดเชื้อจะมีลักษณะบวม แอ่งเลือดขยายขนาดใหญ่ขึ้น มีการรวมตัวกันของ eosinophilic granules, amorphous matter และมีการแทรกซึมของเซลล์เม็ดเลือด หลังจากเซลล์เม็ดเลือดโอบล้อมท่อตับที่ติดเชื้อก็จะกลายเป็น granulomatous capsule ที่บริเวณหัวใจจะมีการแทรกซึมของเม็ดเลือดเข้าไปทำหน้าที่ในจับกินแบคทีเรียที่อยู่ในเนื้อเยื่อหัวใจและพบว่าที่บริเวณผนังเส้นเลือดและบริเวณเนื้อเยื่อด้านในของลิมฟอยด์มีแบคทีเรียเข้าทำลาย บริเวณชั้นเนื้อเยื่อที่มีการติดเชื้อนี้จะเกิดลักษณะเซลล์ตายเป็นจำนวนมาก จาก

นั้นจะสลายตัวและเซลล์เม็ดเลือดก็จะแทรกซึมเข้ามาเพื่อจับกิน นอกจากนั้นยังพบแบคทีเรียจำนวนมากที่บริเวณหัวใจและ spongy connective tissue, haemal sinus, sinus ของกระเพาะอาหาร ทางเดินอาหาร บริเวณที่สร้างเซลล์สืบพันธุ์และบริเวณกล้ามเนื้อ โดยจะพบเซลล์เม็ดเลือดที่ทำหน้าที่ในการจับกินแบคทีเรียเหล่านี้บริเวณอวัยวะที่มีการติดเชื้อ เชื้อแบคทีเรียจะมีการเคลื่อนย้ายไปยังบริเวณซี่เหงือกและเพิ่มจำนวนมากขึ้น ที่บริเวณเปลือกชั้นนอกและบริเวณ spongy connective tissue ของปลายหางก็พบการติดเชื้อนี้โดยจะพบการตายของเนื้อเยื่อเซลล์บุผิวที่บริเวณนี้ด้วย

เนื่องจากเชื้อ *V. harveyi* เป็นสาเหตุให้เกิดโรคเรืองแสงและทำความเสียหายให้แก่การเพาะเลี้ยงกุ้ง ซึ่งเป็นการสูญเสียทางเศรษฐกิจที่สำคัญ การใช้วัคซีนจึงเป็นแนวทางหนึ่งในการป้องกันการเกิดโรคเรืองแสง ซึ่งมีความจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาถึงวิธีการผลิตวัคซีนและลักษณะการใช้วัคซีนที่เหมาะสม เพื่อนำไปสู่การป้องกันการเกิดโรคติดเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำต่อไปในอนาคต

1.1 **ลักษณะของเชื้อ *V. harveyi***

เชื้อ *V. harveyi* เป็นเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* คืออยู่ในอาณาจักรโปรคาริโอต (Procaryote) ในดิวิชันของแบคทีเรีย เมื่อจำแนกประเภทแบคทีเรียตาม Bergey's Mannual of Systematic Bacteriology (Baumann *et al.*, 1984) พบว่าอยู่ในตอนของแบคทีเรียแกรมลบทั่วไป โดยอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน เติบโตได้ทั้งในสภาพที่ใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจน (facultative anaerobic gram-negative rods) อยู่ในวงศ์ Vibrionaceae ซึ่งลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ *V. harveyi* ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1 ส่วนเชื้อในวงศ์ Vibrionaceae มีลักษณะทั่วๆไปดังนี้คือ

1. เซลล์มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.3-1.3 μm
2. เซลล์เป็นท่อนตรงหรือโค้ง
3. เคลื่อนที่โดยใช้แฟลเจลลาที่ขั้ว (polar flagella)
4. โดยปกติให้ผลบวกในการทดสอบออกซิเดส
5. บางพวกต้องการเกลือหรือเกลือ มีส่วนช่วยกระตุ้นการเติบโต
6. ไม่มีเอนเทอโรแบคทีเรียล คอมมอน แอนติเจน (enterobacterial common antigen)

7. ต้องการอาหารง่ายๆในการเติบโต

โดยเชื้อชนิดนี้จัดอยู่ในสกุล Vibrio ซึ่งโดยทั่วไปจะมีรูปร่างเป็นท่อนตรงหรือท่อนโค้ง เคลื่อนที่โดยใช้แฟลเจลลาที่ขั้ว โดยแฟลเจลลามีถุงหุ้มอีกชั้น (sheated flagella) พบในน้ำที่มีความเค็มในช่วงกว้าง บางชนิดสามารถเปล่งแสงสีน้ำเงิน-เขียว (bioluminescence) ซึ่งปฏิกิริยานี้เกิดขึ้นโดยอาศัยออกซิเจน โดยมีเอนไซม์ลูซิเฟอเรส (luciferase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *V. harveyi* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมงจะมีลักษณะเรียบ โคโลนีกลม นูน มีสีขาวนวลสะท้อนแสง เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีประมาณ 2-3 mm ถ้าอยู่ในที่มืดจะเห็นโคโลนีเรืองแสง (Lavilla-Pitogo, 1990) เจริญได้ทั้งในที่ที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน สร้างเอนไซม์คะตาเลส (catalase) ออกซิเดส (oxidase) อะไมเลส (amylase) ไลเปส (lipase) และเจลลาติเนส (gelatinase) สร้างกรดจากการเฟอร์เมนต์กลูโคส (glucose) มอลโตส (moltose) ซูโครส (sucrose) แมนนิทอล (mannitol) กาแลคโตส (galactose) และฟรุคโตส (fructose) แต่ไม่พบการเฟอร์เมนต์น้ำตาลอราบิโนส (arabinose)และดูลซิโทล (dulcitol)ฯ ลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ *V. harveyi* แสดงในตารางที่ 1 และจากการทดสอบความไวต่อยาพบว่าเชื้อ *V. harveyi* มีความไวต่อยาคลอแรมเฟนนิคัล (chloramphenicol) ไตรเมธโธพริม-ซัลฟาเมธอกซาโซล (trimethoprim-sulfamethoxazole) กานามัยซิน (kanamycin) เจนตามัยซิน (gentamycin) อะมิกาซิน (amikacin) ซัลฟาฟูลาโซล (sulfafurazole) ซัลฟาโลธิน (sulfalothine) (ดารุณี แซ่อุ่ย และคณะ, 2530; Baticados *et al.*, 1990; Le groumellec *et al.*, 1995) นาลิดิซิค แอซิด (nalidixic acid) โนโวไบโอซิน (novobiocin) นีโอมัยซิน (neomycin) ซัลฟาไดอะซีน (sulfadiazine) เตตร้าซัยคลิน (tetracycline) (ดารุณี แซ่อุ่ย และคณะ, 2530) ฟูราโซลิโดน (furazolidone) ไนโตรฟูราโซน (nitrofurazone) พรีฟูแรน (prefuran) (Baticados *et al.*, 1990) และเชื้อ *V. harveyi* ดื้อต่อยาแอมพิซิลลิน (ampicillin) สเตรปโตมัยซิน (streptomycin) พอลิมัยซินบี (polymycin B) 0/129 (ดารุณี แซ่อุ่ย และคณะ, 2530 ; มณเฑียร ส่งเสริม และคณะ, 2533) ในขณะที่ Karunanasagar และคณะ (1994) พบว่าเชื้อ *V. harveyi* มีความต้านทานต่อยาคลอแรมเฟนนิคัลและโคไตรมอกซาโซล (cotrimoxazole) และจากการทดลองของ Le Groumellec และคณะ (1995) ได้

ทำการทดสอบความต้านทานยาของเชื้อ *V. harveyi* สายพันธ์ B8-2 ที่แยกได้จากประเทศเอควาดอร์และ สายพันธ์ BL 1ที่แยกเชื้อมาจากลูกกุ้งของประเทศไทย พบว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ (minimum inhibitor concentration; MIC) ของยาคลอแรมเฟนนิคัล ไธแอ็มเพ็นนิคัล (thiamphenicol) ควิโนโลน (quinolone) และเตตร้าซัยคลินของทั้ง 2 สายพันธุ์ มีความแตกต่างกันและพบว่าเชื้อ *V. harveyi* มีความต้านทานต่อยาที่มีการใช้กันเป็นประจำในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำโดยเฉพาะอย่างยิ่งยาคลอแรมเฟนนิคัลและเตตร้าซัยคลินมากขึ้น

ตารางที่ 1 ลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ *V. harveyi* (Baumann *et al.*, 1984)

ลักษณะ	*Vibrio harveyi*
Gram stain	Gram negative
Rods shape	+
Motility	+
Flagella	Polar (1) peritrichous
Swarming	-
Gas from D-glucose	-
Nitrate reduction	+
Oxidase	+
Catalase	+
Luminescence	+
Enzyme production	
- amylase	+
- chitinase	+
- gelatinase	+
- lipase	+
Arginine dihydrolase	-

+ = ให้ผลบวก - = ให้ผลลบ +/- = ผลไม่ชัดเจนระหว่างบวกและลบ

ตารางที่ 1 (ต่อ)

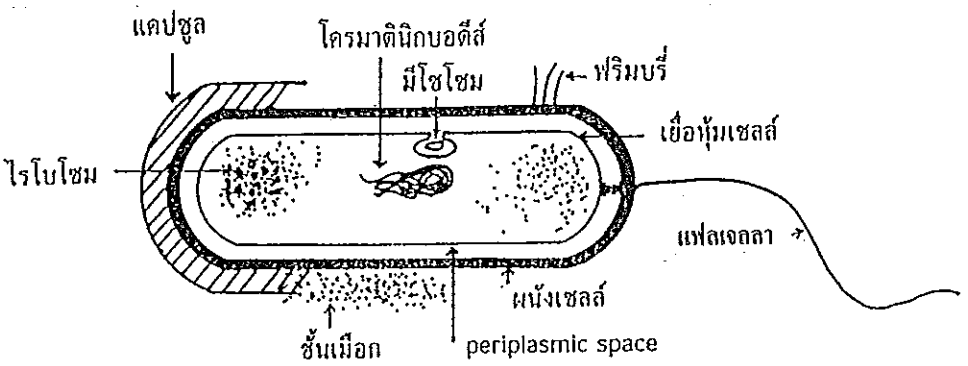
ลักษณะ	*Vibrio harveyi*
Decarboxylase	
- ornithine decarboxylase	+
- lysine decarboxylase	+
Ferment to Acid	
- glucose	+
- maltose	+
- mannitol	+
- sucrose	+/-
- lactose	-
- arabinose	+
- galactose	+/-
- mannose	+
- salicin	+/-
- D-xylose	-
- fructose	+
Growth at 4 °c	-
Growth at 35 °c	+
Production of acetone and/or diacetyl	-

+ = ให้ผลบวก - = ให้ผลลบ +/- = ผลไม่ชัดเจนระหว่างบวกและลบ

1.2 โครงสร้างของแบคทีเรีย

แบคทีเรียมีโครงสร้างไม่ซับซ้อนเหมือนเซลล์สัตว์ชั้นสูง ยกเว้นผนังเซลล์ซึ่งมีลักษณะซับซ้อนกว่า (ภาพที่ 1) โครงสร้างของแบคทีเรียแบ่งได้เป็น 2 ส่วนคือ โครงสร้างภายนอกได้แก่ แคปซูล ผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์ แฟลเจลลาและพิไล ส่วนโครงสร้างที่อยู่ภายในเป็นส่วนประกอบทั้งหมดของเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มอยู่ภายในเยื่อหุ้มเซลล์ได้แก่ ไซโทพลาซึม ไรโบ

โซม โครมาตินิกบอดีส์ สปอร์ เม็ดสีและสารสังเคราะห์แสง ในที่นี้จะขอกล่าวถึงเฉพาะโครงสร้างของแบคทีเรียที่มีผลต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง



ภาพที่ 1 ไดอะแกรมแสดงโครงสร้างของแบคทีเรีย

ที่มา : สุวณี สุภเวชย์, 2536

1.2.1 **ผนังเซลล์** (cell wall)

เป็นโครงสร้างส่วนที่อยู่ใต้แคปซูลหรือชั้นเมือก และอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ แบคทีเรียทุกชนิดยกเว้นเชื้อในวงศ์ Mycoplasma มีโครงสร้างส่วนนี้ ผนังเซลล์เป็นส่วนประกอบ 20 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ ประกอบด้วยเพปไทด์ (peptide) พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) และลิปิด (lipid) ซึ่งมีองค์ประกอบย่อยแตกต่างกันในแบคทีเรียแต่ละชนิด ผนังเซลล์เป็นส่วนที่มีความแข็งแกร่งเนื่องมาจากมีโครงสร้างซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยพอลิแซ็กคาไรด์และเพปไทด์ที่มีชื่อเรียกต่างๆกันคือ เพปทิโดกลัยแคน (peptidoglycan) มิวรีน (murein) มิวโคเพปไทด์ (mucopeptide) หรือกลัยโคซามิโนเพปไทด์ (glycosaminopeptide)

เพปทิโดกลัยแคน เป็นพอลิเมอร์ขนาดใหญ่มีองค์ประกอบ 3 ส่วนคือ ส่วนที่เป็นแกนกลาง (backbone) หรือสายกลัยแคน (glycan strands) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นสายยาว ประกอบด้วยหน่วยย่อย คือ เอ็น-อะเซทิลกลูโคซามีนสลับกับกรดเอ็น-อะเซทิลมิวรามิก เป็นหน่วยซ้ำๆกันประมาณ 10-64 หน่วย ส่วนที่สองเป็นเททระเพปไทด์ (tetrapeptide) ห้อยต่ออยู่กับกรดเอ็น-อะเซทิลมิวรามิก และส่วนที่สามเป็นเพปไทด์อีกชุดหนึ่งซึ่งเชื่อมเพปที

โดกลัยแคนสายที่ใกล้กันทางขวาง (ภาพที่ 2) ส่วนที่เป็นแกนกลางจะเหมือนกันหมดในแบคทีเรียทุกเชื้อสาย ส่วนที่เป็นเททระเพปไทด์ที่ห้อยอยู่และเพปไทด์ซึ่งเชื่อมขวางจะแตกต่างกันในแต่ละเชื้อสาย เททระเพปไทด์ที่ต่ออยู่กับกรดเอ็น-อะเซทิลมิวรามิกเรียงตามลำดับ คือ แอล-อะลานีน ดี-กลูตามีน แอล-ไดอะมิโน แอสิด ดี-อะลานีน (L-alanine-D-glutamine-L-diamino acid-D-alanine) ตำแหน่งที่ 1, 2 และ 4 ของเพปไทด์ชุดนี้จะคงตัว ยกเว้นในตำแหน่งที่ 3 ซึ่งเป็น ไดอะมิโน แอซิด จะแตกต่างกันออกไป ในแบคทีเรียแกรมลบจะเป็นกรดไดอะมิโนพิเมลิก (หรือ DAP) เนื่องจากเพปทิโดกลัยแคนทุกสายจะถูกเชื่อมกันทางขวางทำให้เพปทิโดกลัยแคนชั้นต่างๆของแบคทีเรียเชื่อมต่อกันเป็นโมเลกุลใหญ่โมเลกุลเดียว ผนังเซลล์ในแบคทีเรียแกรมบวกจะประกอบด้วยเพปทิโดกลัยแคน 40 เส้น ซึ่งประกอบกันเป็น 90 เปอร์เซ็นต์ขององค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบจะมีเพปทิโดกลัยแคนเพียงเส้นเดียว และประกอบกันเป็น 5-20 เปอร์เซ็นต์ของผนังเซลล์ ซึ่งผนังเซลล์ของ *V. harveyi* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบมีโครงสร้างดังนี้

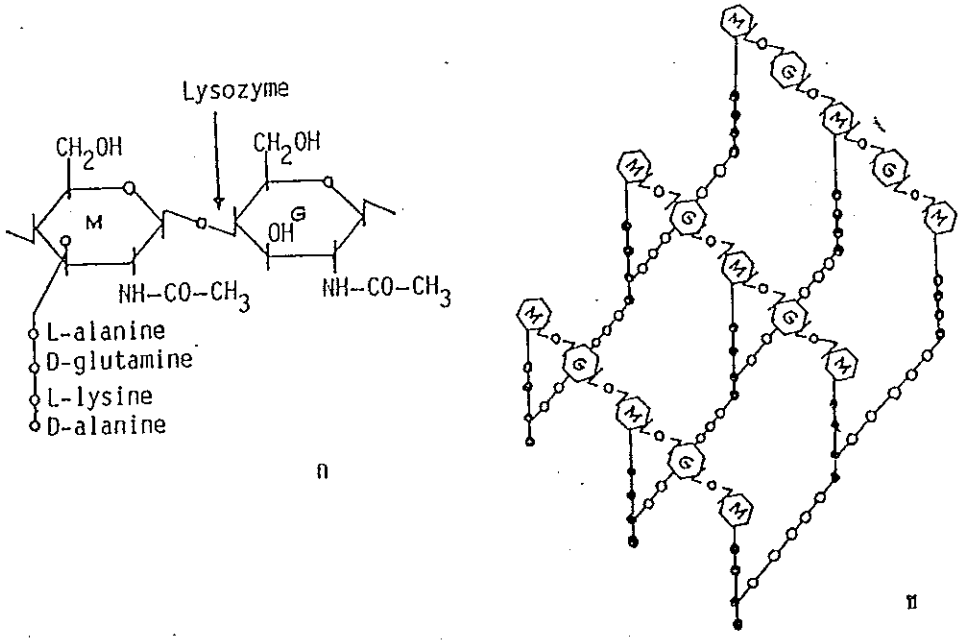
ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบบางกว่าแกรมบวก แต่มีส่วนประกอบทางเคมีและโครงสร้างซับซ้อนมากกว่า คือประกอบด้วยเยื่อบุชั้นนอก และชั้นเพปทิโดกลัยแคนซึ่งอยู่ในช่องว่างระหว่างเยื่อบุชั้นนอกและเยื่อหุ้มเซลล์ที่เรียกว่าเพอริพลาสมิค สเปซ (periplasmic space) (ภาพที่ 3)

เยื่อบุชั้นนอก มีรูปพรรณและโครงสร้างเช่นเช่นเดียวกับเยื่อหุ้มเซลล์แต่มีฟอสโฟลิปิด (phospholipid) และโปรตีนน้อยกว่า นอกจากนี้มีส่วนประกอบที่พบเฉพาะในเยื่อบุชั้นนอก คือ ไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide หรือ LPS) เยื่อบุชั้นนอกเป็นส่วนที่เกี่ยวกับการผ่านเข้าออกของสารละลายหลายชนิด และยังมี recepter สำหรับแบคเทอริโอเฟจ (bacteriophage) และแบคเทอริโอซิน (bacteriocins) นอกจากนี้ยังมีหน้าที่อื่นๆเช่น การแบ่งตัว การถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบ conjugation มีระบบต่างๆที่ช่วยให้สารอาหารและโมเลกุลเล็กๆผ่านเข้าไปในเพอริพลาสมิค สเปซ และยังเป็นส่วนที่ร่วมกับเพปทิโดกลัยแคนในการสร้างความแข็งแกร่งให้กับผนังเซลล์

ไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ (LPS) เป็นส่วนประกอบที่มีในแบคทีเรียแกรมลบเท่านั้น และมีความสำคัญทั้งในแง่ของโครงสร้างและหน้าที่เพราะเป็นส่วนประกอบของแอนติเจนที่ผิวเซลล์ คือ โอ แอนติเจน (O antigen) และเอนโดทอกซิน (endotoxin) ไลโปพอลิแซ็ก

คาไรด์เป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงและซับซ้อนประกอบด้วยส่วนที่เป็นลิปิด เรียกว่าลิปิด เอ (lipid A) ติดต่ออยู่กับพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นแกนกลาง (core polysaccharide) ซึ่งจะเหมือนๆกันสำหรับแบคทีเรียในสกุลเดียวกัน และที่ส่วนปลายที่เป็นพอลิแซ็กคาไรด์จำเพาะ (specific polysaccharide region) ซึ่งเป็นหน่วยซ้ำๆของน้ำตาลมีคาร์บอนในโมเลกุล 3 ตัว หรือห้าตัวต่อกันเป็นสาย เรียกว่า o-specific chains พอลิแซ็กคาร์ไรด์ส่วนปลายนี้จะยื่นออกมาจากเยื่อหุ้มชั้นนอก จึงเป็นส่วนที่ป้องกันเซลล์จากแอนติบอดี (antibody) และคอมพลีเมนต์ (complement) ส่วนประกอบทั้งสามส่วนของไลโปพอลิแซ็กคาไรด์เรียงกันเป็นลักษณะดังนี้

ส่วนที่เป็นพอลิแซ็กคาไรด์จำเพาะ + พอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นแกนกลาง + ลิปิด เอ

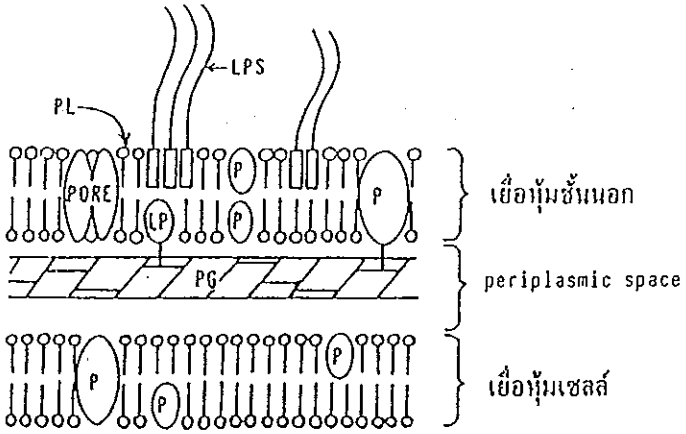


ภาพที่ 2 โครงสร้างของเพปทิโดกลัยแคน M= กรดเอ็น-อะเซทิลมิวรามิก G= เอ็น-อะเซทิลกลูโคซามีน

ภาพ ก. หน่วยซ้ำๆของกรดเอ็น-อะเซทิลมิวรามิกและเอ็น-อะเซทิลกลูโคซามีน และเททระเพปไทด์

ภาพ ข. การเชื่อมต่อทางขวางระหว่างเพปทิโดกลัยแคนสายที่อยู่ใกล้เคียงกัน

ที่มา : สุวณี สุภเวชย์, 2536



ภาพที่ 3 ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ LPS= ไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ PL= ฟอสโฟไลปิด PG= เพปทิโดกลัยแคน LP= ไลโปโปรตีน P= โปรตีน

ที่มา : สุวณี สุภเวชย์, 2536

2. **การทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก** (break-cell)

การทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแตกโดยยังต้องการส่วนของผนังเซลล์ไว้มักจะใช้วิธีกล (mechanical breakage) เช่น ใช้คลื่นเสียงอัลทราโซนิกส์ (ultrasonics) ใช้เครื่องมือที่มีแรงอัดทำให้เซลล์แตกได้แก่พวก French press, Manton-gaulin homogenizer หรือใช้การเสียดสีจาก bead ได้แก่พวก Braun homogenizer, bead beater, Dynomill, mini-mill หรือใช้การเสียดสีกับเม็ดทรายหรืออลูมินัม (Hancock and Poxton, 1988) จากการศึกษาการทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกมีวิธีการต่างๆดังนี้

Anderson และ Archibald (1975) ใช้วิธีการเสียดสีด้วย bead ในการทำให้เซลล์ของ *Bacillus stearothermophilus* B65 แตก โดยใช้เวลาประมาณ 1-3 นาที พบว่าเซลล์แตกประมาณ 75-100 เปอร์เซ็นต์

Burnell และคณะ (1980) ใช้วิธี French press เพื่อทำให้เซลล์ *Escherichia coli* แตกโดยสามารถรักษาสภาพของผนังเซลล์ด้านใน (inner membrane) ไว้ได้สมบูรณ์ วิธีการนี้ใช้เวลาประมาณ 1-5 นาทีและทำให้เซลล์แตกได้ประมาณ 75-100 เปอร์เซ็นต์

Taku และ Fan (1979) ทำการแยกผนังเซลล์ของ *B. megaterium* โดยการใช้คลื่นเสียงอัลทราโซนิกส์ในระดับ 20 KHz โดยทำการละลายเชื้อใน TMD buffer (Tris 0.05 M HCl; 20 mM $MgCl_2$ และ 0.5 - 1 mM dithiothreitol) แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 90 วินาทีจากนั้นจึงนำไปเข้าเครื่อง sonicator วิธีการนี้ทำให้เซลล์แตกได้ประมาณ 10-90 เปอร์เซ็นต์

Wickus และ Strominger (1972) ทำการแยกเอนไซม์จากแบคทีเรีย *B. megaterium* โดยการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีการใช้ glass bead ขนาด 120 µm ใส่ในเครื่อง Gifford-Wood Mini-Mill และใส่สารป้องกันการเกิดโฟม ใช้ความเร็วสูงสุดของเครื่องเป็นเวลาประมาณ 25 นาที

3. ระบบภูมิคุ้มกันในกุ้ง

กุ้งกุลาดำ เป็นสัตว์ที่จัดอยู่ในกลุ่มสัตว์จำพวกกุ้ง (crustacean) ซึ่งอยู่ในไฟลัมสัตว์ที่มีขาปล้อง (arthropoda) จัดเป็นสัตว์ในกลุ่มที่ไม่มีกระดูกสันหลัง ซึ่งระบบภูมิคุ้มกันที่ตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกายจะแตกต่างกับสัตว์ในกลุ่มที่มีกระดูกสันหลัง นั่นคือกุ้งจะมีการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาภายในร่างกายแบบไม่จำเพาะเจาะจง เนื่องจากไม่พบว่าในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งมีความสามารถในการจดจำถึงสิ่งแปลกปลอมที่เคยเข้ามาภายในร่างกาย จึงไม่สามารถสร้างสารที่ตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมที่เคยเข้ามาภายในร่างกายได้อย่างรวดเร็วเหมือนในการสร้างแอนติบอดี (antibody) ในสัตว์ชั้นสูง พบว่าเซลล์หลักที่ทำหน้าที่ในการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาภายในร่างกายของกุ้งคือ เซลล์เม็ดเลือด (Soderhall and Cerenius, 1992) โดยเซลล์เม็ดเลือดนี้จะกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยกระบวนการต่างๆเช่น ฟาโกซัยโทซิส (phagocytosis), เอนแคปซูเลชัน (encapsulation), โนดูลฟอร์เมชัน (nodule formation) และกระบวนการอื่นๆ

3.1 ชนิดของเม็ดเลือด (haemocyte types)

การจำแนกชนิดของเม็ดเลือดของกุ้งสามารถแบ่งออกได้ 3 ประเภท ซึ่งในการจำแนกนี้จะใช้วิธีการปั่นแยกสารที่มีลำดับความหนาแน่นต่างกัน (density gradient centrifugation) โดยใช้สารกันเลือดแข็งตัว ซึ่งประกอบด้วย EDTA citrate buffer (pH 4.6) ช่วย (Soderhall and Smith, 1983 อ้างโดย Soderhall and Cerenius, 1992) สิ่งที่ช่วยในการ

จำแนกคือลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) และองค์ประกอบของไซโทพลาซึมซึ่งสามารถจำแนกได้ดังนี้

1. **อะแกรนูโลไซท์** (agranulocyte) หรือไฮยาลินเซลล์ (hyaline cell) เป็นกลุ่มที่ไม่มีแกรนูลหรือมีแกรนูลจำนวนเล็กน้อยมากในไซโทพลาซึม แต่บางครั้งเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนจะพบไซโทพลาสมิกอินคลูชัน เซลล์ชนิดนี้มีรูปร่างคล้ายกระสวยหรือค่อนข้างกลม นิวเคลียสมีขนาดใหญ่อยู่ตรงกลางเซลล์ ภายในเซลล์มีอัตราส่วนของนิวเคลียสต่อไซโทพลาซึมอยู่สูง มี rough endoplasmic reticulum (RER), free ribosome และ ไมโทคอนเดรีย (mitochondria) เซลล์ชนิดนี้สามารถเกาะและยึดตัวติดกระจกสไลด์ได้ และทำหน้าที่ในการจับกินสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาภายในร่างกายของกุ้งโดยกระบวนการฟาโกซัยโทซิส นอกจากนั้นยังชักนำให้เกิดการเริ่มต้นของกระบวนการ coagulation (Hose and Matin, 1989) จำนวนของไฮยาลินเซลล์ในกุ้งแต่ละชนิด (species) จะแตกต่างกัน เช่น ใน *P. japonicus* จะมีจำนวนไฮยาลินเซลล์ 10 เปอร์เซ็นต์ ในระบบหมุนเวียนเลือดของร่างกายในขณะที่ไม่พบไฮยาลินเซลล์เลยใน *P. adspersus* และ *Macrobrachium rosenbergii* (Tsing *et al.*, 1989)

2. **เซมิแกรนูลาร์ ฮีโมไซท์** (semigranular haemocyte) เซลล์กลุ่มนี้ประกอบด้วยแกรนูลในปริมาณน้อย และจำนวนแตกต่างกันออกไปมีรูปร่างหลายแบบคือ รูปร่างกลม รูปไข่ รูปกระสวย ภายในเซลล์มีไลโซโซมอล เอนไซม์ (lisosomal enzyme) แอซิด ฟอสฟาเตส (acid phosphatase) เอสเทอเรส (esterase) และ เบตา-กลูโคโรนิเดส (β-glucoronidase) (Hose and Matin, 1989) คาดว่าเซลล์ชนิดนี้จะทำหน้าที่ในการจดจำและตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาสู่ร่างกาย โดยการช่วยย่อยสารที่อยู่ในแกรนูลและเข้าไปจับที่บริเวณสิ่งแปลกปลอม (Johansson and Soderhall, 1989) ซึ่งสังเกตได้ โดยพบว่ามีเพียงเซลล์ชนิดนี้เท่านั้นที่เข้าทำปฏิกิริยากับสารพอลิแซ็กคาไรด์ของเชื้อโรคเช่นสารไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ และ β-1,3-glucan โดยจะทำการปล่อยสารที่อยู่ในแกรนูลและชักนำให้เกิดกระบวนการเอนแคปซูเลชันด้วย หน้าที่หลักของเซลล์นี้ ในกุ้งน้ำจืดและในกุ้งทะเลเป็นที่เก็บสะสมโปรฟีนอลออกซิเดส แอกทิเวติง ซิสเต็ม (prophenoloxidase activating system ; proPO system) โดยกลไกของระบบนี้จะหลั่งสารจากระบบเพื่อมาย่อยสลายเซลล์แปลกปลอม สารพอลิแซ็กคาไรด์ของจุลชีพไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดการย่อยสลายได้โดยกลุ่ม

เซลล์เม็ดเลือดชนิดที่สามคือแกรนูลลาร์เซลล์ ในขณะที่สามารถทำให้เกิดการหลั่งสารของระบบนี้จากเซมิแกรนูลลาร์เซลล์ได้ (Johansson and Soderhall, 1985 อ้างโดย Soderhall and Cerenius, 1992) และเซลล์เม็ดเลือดชนิดนี้ยังทำหน้าที่ในการเกิดกระบวนการฟาโกซัยโทซิสและเอนแคปซูเลชัน (Hose and Matin, 1989)

3. **แกรนูลโลไซท์** (granulocyte) เป็นกลุ่มเม็ดเลือดที่มีแกรนูลขนาดใหญ่บางครั้งเรียกลาร์จแกรนูลาร์ ฮีโมไซท์ (large granular haemocyte) มีรูปร่างหลายแบบ ภายในเซลล์มีแอซิด ฟอสฟาเตสในปริมาณที่น้อยกว่า เซมิแกรนูลาร์ ฮีโมไซท์ แต่มีปริมาณของเอสเทอเรส และ เบตา-กลูโคโรนิเดส ในปริมาณที่เท่ากัน (Hose and Matin, 1989) หน้าที่ของเม็ดเลือดชนิดนี้ คาดว่าจะเป็นตัวหลักในโปรฟีนอลออกซิเดส แอกทิเวติง ซิสเต็มแต่จะไม่มีการหลั่งสารในแกรนูล จากการได้รับการกระตุ้นจากสารพอลิแซ็กคาไรด์ เช่นเดียวกับในกลุ่มของเซมิแกรนูลาร์เซลล์แต่จะไปเกี่ยวข้องกับสารที่หลั่งจากระบบโปรพีโอ (proPO system) คือโปรตีนที่มีขนาด 76 kilodalton (KD) โดยเม็ดเลือดแกรนูลโลไซท์จะไปทำปฏิกิริยากับโปรตีนขนาด 76 KD และ β-1,3 กลูแคนบายดิ้งโปรตีน (β-1,3 glucan binding protein) เพื่อหลั่งสารในระบบโปรพีโอออกมา ลักษณะและหน้าที่ของเม็ดเลือดแสดงไว้ในตารางที่ 2 และ 3

ตารางที่ 2 ลักษณะของเม็ดเลือดทั้ง 3 ชนิดที่ใช้เป็นเกณฑ์ในการแยกชนิดของเม็ดเลือด

หน้าที่ / ชนิด	agranulocyte	semigranulocyte	granulocyte
phagocytosis	+	จำกัด	-
encapsulation	-	+	จำกัด
cytotoxicity	ไม่มีข้อมูล	+	+
pro-PO system	-	+	+

ที่มา : Soderhall และ Cerenius, 1992

ตารางที่ 3 แสดงลักษณะ คุณสมบัติ และหน้าที่ของเซลล์เม็ดเลือดแต่ละชนิด

ชนิด	คุณสมบัติ
agranulocyte	ไม่มีแกรนูล หรือมีจำนวนน้อย มี nucleocytoplasmic ในอัตราที่สูง มี RER, free ribosome และ mitochondria เป็น initiate coagulation.
semigranulo-cyte	มีขนาดใหญ่กว่ากลุ่มที่ไม่มีแกรนูล ประกอบด้วย แกรนูลขนาดเล็กๆ ภายในไซโทพลาสซึมมี lysosomal enzyme และ prophenoloxidase (PPO) ชักนำให้เกิด recognition และเกิดเอนแคปซูเลชัน ใน fungal hyphae.
granulocyte	มีแกรนูลจำนวนมาก อัตราการฟาโกซัยโทซิส เชื้อแบคทีเรียและปริมาณของ acid phosphate น้อยกว่ากลุ่มที่มีแกรนูลพอประมาณ แต่มีปริมาณของ β-glucoronidase และ esterase เท่ากัน มีปริมาณ PPO มาก

ที่มา : Hose และ Martin, 1989

3.1 **กระบวนการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ตัวกุ้งมีดังต่อไปนี้**

1. ฟาโกซัยโทซิส
2. โนดูลฟอร์เมชัน
3. กระบวนการเอนแคปซูเลชัน
4. ไซโททอกซิคซิตี้ (cytotoxicity)
5. กระบวนการที่เกี่ยวข้องกับเลคติน (lectins)
6. ระบบโปรฟีนอลออกซิเดส แอกทิเวติง ซีสเตม

1. **ฟาโกซัยโทซิส**

เป็นกระบวนการที่สำคัญที่สุดอย่างหนึ่งของระบบภูมิคุ้มกัน เพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อโรคผ่านเข้ามาภายในร่างกาย ภายหลังจากที่เชื้อผ่านผิวหนังชั้นนอกเข้ามาแล้ว หากเราไม่แยกชนิดของเม็ดเลือดออกจากกัน พบว่าในกุ้งจะมีอัตราการเกิดฟาโกซัยโทซิสตั้งแต่ 1-2 เปอร์เซ็นต์จนถึง 28 เปอร์เซ็นต์ (Peterson *et al.*, 1976) มีการศึกษาในกุ้งน้ำจืด พบว่าประสิทธิภาพการเกิดฟาโกซัยโทซิสเชื้อแบคทีเรียขึ้นอยู่กับองค์ประกอบที่อยู่ในน้ำเลือด ในขณะที่ในปูทะเลจะไม่พบว่าออฟโซนิคแฟคเตอร์มีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพในการเกิดฟาโกซัยโทซิสเชื้อโรค จึงไม่แน่ใจว่าประสิทธิภาพของการเกิดฟาโกซัยโทซิสที่เพิ่มขึ้นมานั้นอาจมาจากผลโดยทางอ้อมของระบบโปรพีโอ (proPO-system) เนื่องจากเมื่อนำเซลล์เม็ดเลือดมา

สัมผัสกับ β-1,3-glucan ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นการทำงานของระบบโปรพีโอแล้วจะทำให้มีอัตราการเกิดฟาโกซัยโทซิสเพิ่มขึ้น 5-7 เท่า (Soderhall and Cerenius, 1992) และยังพบว่าอัตราการเกิดฟาโกซัยโทซิสจะเพิ่มมากขึ้นถึง 3 เท่าเมื่อทำการออพโซไนส์ (opsonize) ด้วย haemocytelysate ซึ่งคาดว่าออพโซนิน (opsonin) ตัวนี้จะไม่ใช่สารฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase) โดยตรงแต่อาจเป็นตัวโปรตีนขนาด 76 KD ที่สามารถเพิ่มอัตราเร็วของการเกิดการเอนแคปซูเลชั่นได้ด้วย และจากการศึกษาของ Goldenberg และคณะ (1984) พบว่าการใช้เม็ดเลือดแดงของแกะ (sheep red blood cell ; SRBC) สามารถกระตุ้นให้อัตราการเกิดฟาโกซัยโทซิสในกุ้ง american lobster (*Homarus americanus*) เพิ่มมากขึ้น

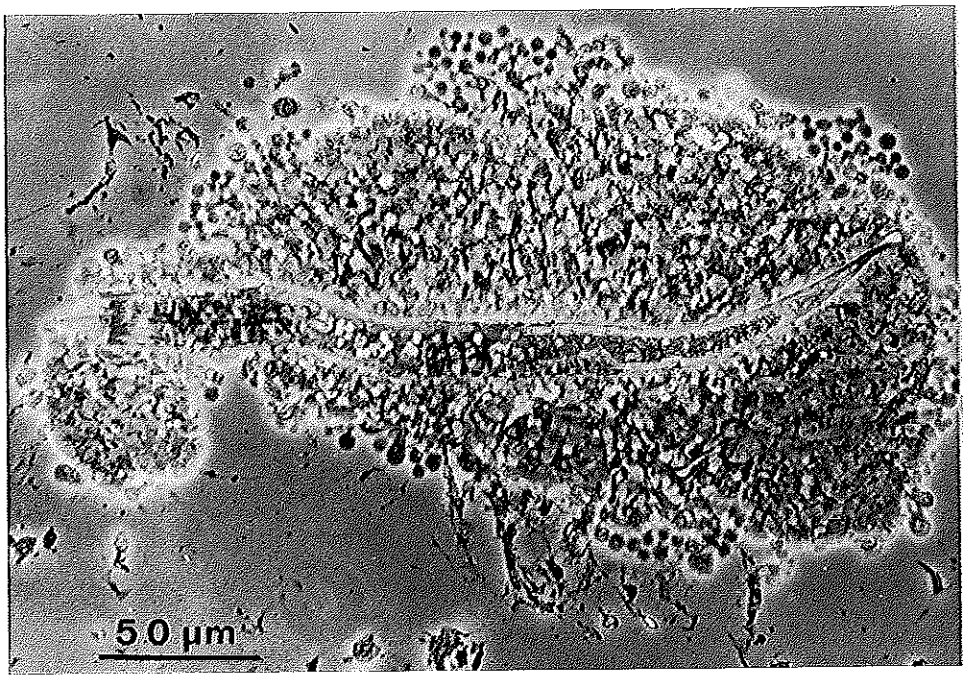
2. โนดูลฟอร์เมชั่น

เมื่อมีจุลชีพจำนวนมากเข้าสู่ร่างกาย กระบวนการฟาโกซัยโทซิสไม่สามารถที่จะกำจัดจุลชีพนั้นได้หมด ดังนั้นจะมีกระบวนการสร้างโนดูล (nodule) ซึ่งเป็นกลุ่มเซลล์ที่รวมตัวกันรอบสิ่งแปลกปลอม สามารถพบกระบวนการนี้ได้ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังทั่วไป โดยรวมถึงกลุ่มครัสเตเชี่ยนด้วย ผลจากการเกิดโนดูลคือพวกจุลชีพจะติดอยู่ที่บริเวณผิวชั้นต่างๆ ของเม็ดเลือด และต่อมากลุ่มโนดูลนั้นจะเปลี่ยนกลายเป็นสีดำ (melanized) เนื่องจากกระบวนการของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในตัวกุ้ง แบคทีเรียจะมีการเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วจากระบบหมุนเวียนโลหิต และบริเวณที่เกิดการรวมตัวของเม็ดเลือดไปยังบริเวณเหงือกหรือบางครั้งก็ไปยังบริเวณท่อตับ (Smith and Ratcliffe, 1980) โดยเชื่อว่าเหงือกและตับจะเป็นบริเวณหลักที่เชื้อโรคเข้าไปอาศัยอยู่ แต่ก็อาจเกิดขึ้นในบริเวณอื่นด้วยเช่นกัน

3. กระบวนการเอนแคปซูเลชั่น

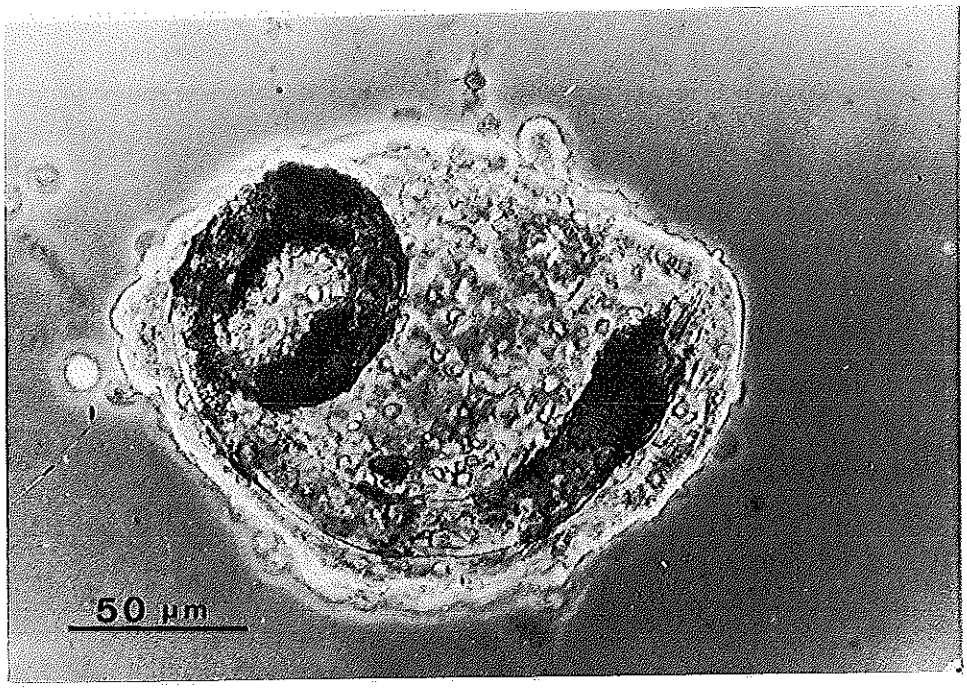
เมื่อสิ่งแปลกปลอมมีขนาดใหญ่ เช่น ปรสิตต่างๆ บุกรุกเข้ามาในร่างกายซึ่งเกินความสามารถในการกำจัดด้วยกระบวนการฟาโกซัยโทซิสก็จะเกิดกระบวนการเอนแคปซูเลชั่น (ภาพที่ 4-6) ขึ้นโดยมีฮีโมไซท์หลายชนิดเข้ามาช่วยกัน จากการพัฒนาเทคนิควิธีการแยกชนิดของเซลล์เม็ดเลือดในกุ้งน้ำจืดทำให้จำแนกได้ว่าเซลล์เม็ดเลือดชนิดไหนที่ตอบสนองต่อโมเลกุลของสิ่งแปลกปลอม โดยมีเพียงกลุ่มชนิดเดียวเท่านั้นที่เข้าจับกับโมเลกุลของสิ่งแปลกปลอมพวก β-1,3-glucan จากเชื้อราหรือกลุ่มเอนโดทอกซิน (endo toxin) และพวกไลโปพอลิแซคคาไรด์จากแบคทีเรียนั้นคือกลุ่มเซมิแกรนูลลาร์เซลล์ โดยเซลล์ชนิดนี้จะเป็นเซลล์แรกที่เข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลสิ่งแปลกปลอมและเกิดกระบวนการเอนแคปซูเลชั่นเซลล์สิ่งแปลกปลอม โดยพบว่ามีโปรตีนขนาด 76 KD เป็นออพโซนิน (opsonin)

ตัวสำคัญในปฏิกิริยานี้ และยังพบว่าโปรตีนชนิดนี้เข้ามามีส่วนช่วยในระบบโปรพีโอในกุ้งน้ำจืดแต่กลไกของมันยังไม่แน่ชัด โปรตีนชนิดนี้ทำหน้าที่หลายอย่างเช่น ช่วยในการจับเชื้อ และเกิดดีแกรนูเลชั่น (degranulation) ในแกรนูลาร์เซลล์และเซมิแกรนูลาร์เซลล์ นอกจากนั้นยังช่วยกระตุ้นให้เกิดกระบวนการเอนแคปซูเลชั่น และอาจเป็นตัวกระตุ้นในการเกิดการฟาโกซัยโทซิสดังที่ได้กล่าวมาในข้างต้น (Soderhall and Cerenius, 1992)



ภาพที่ 4 การเกิดเอนแคปซูเลชันในการกำจัดปรสิตของเซลล์เม็ดเลือดภายหลังจากการติดเชื้อปรสิต 12 - 24 ชั่วโมง

ที่มา : Maramorosch and Shope, 1975



ภาพที่ 5 การเกิดเอนแคปซูเลชันในการกำจัดปรสิตของเซลล์เม็ดเลือดภายหลังจากการติดเชื้อปรสิต 48 ชั่วโมง

ที่มา : Maramorosch and Shope, 1975

ภาพที่ 6 การเกิดเอนแคปซูเลชันในการกำจัดปรสิตของเซลล์เม็ดเลือดภายหลังจากการติดเชื้อปรสิต 72 ชั่วโมง

ที่มา : Maramorosch and Shope, 1975

4. ไซโทท๊อกซิคซิตี้

มีการศึกษาถึงเซลล์ที่ทำให้เกิดไซโทท๊อกซิคซิตี้ของสัตว์กลุ่มครัสเตเชี่ยนจำนวนไม่มากนัก พบว่าในกุ้งน้ำจืดในประเทศออสเตรเลียสามารถทำให้เกิดกระบวนการนี้ได้โดยการใช้เซลล์ที่เป็นมะเร็งเป็นเซลล์ที่ต้องการให้ถูกกำจัด (Tyson and Jenkin, 1974 อ้างโดย Soderhall and Cerenius, 1992) ส่วนกุ้งน้ำจืดในแถบทวีปยุโรป (*Astacus astacus*) เซลล์เม็ดเลือดทำการกำจัดทั้งเซลล์ปกติและเซลล์ที่เป็นมะเร็ง (Soderhall *et al.*, 1985 อ้างโดย Soderhall and Cerenius, 1992) อย่างไรก็ตามในขณะนี้กำลังทำการจำแนกว่าเซลล์ใดที่ทำหน้าที่ตอบสนองในลักษณะนี้และกำลังทดลองว่าหน้าที่หลักในกระบวนการนี้ของเม็ดเลือดเป็นเช่นไร

5. กระบวนการที่เกี่ยวข้องกับเลคติน (lectin)

เลคตินเป็นสารโปรตีนหรือไกลโคโปรตีนที่สามารถเชื่อมต่อกับคาร์โบไฮเดรตได้ มีสารเลคตินหลายๆ ชนิดที่ทำหน้าที่ในการก่อให้เกิดการเกาะกลุ่ม (agglutination) ของเซลล์เม็ดเลือดที่ต่างชนิดกัน เช่น เม็ดเลือดของสัตว์ที่เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งมีคาร์โบไฮเดรตที่มีความจำเพาะอยู่บนผิวของผนังเซลล์ซึ่งเลคตินสามารถเข้ามาจับได้ และถ้าเลคตินนั้นมีลักษณะเป็นไบวาเลนท์ (bivalent) ก็จะสามารถจับได้ถึง 2 เซลล์ ซึ่งก่อให้เกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่มได้ ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีโปรตีนหลายๆ ตัวเช่น ซี-รีแอคทีฟโปรตีน (C-reactive protein) และกลุ่มของไลโปพอลิแซคคาไรด์ บายดิ้ง สามารถที่จะเชื่อมติดกับคาร์โบไฮเดรตและโครงสร้างที่มีความซับซ้อนของผนังเซลล์จุลชีพชนิดต่างๆ เลคตินอาจเป็นตัวการสำคัญในระบบการรับรู้ถึงการแทรกแซงของสิ่งแปลกปลอม (recognition system) ในสัตว์จำพวกกุ้ง (Ratcliffe *et al.*, 1985 อ้างโดย Soderhall and Cerenius, 1992) เหตุผลสนับสนุนประการแรกคือเลคตินสามารถตกตะกอนจุลชีพได้ และประการที่สองสามารถที่จะช่วยเหลือในกระบวนการเชื่อมต่อระหว่างเม็ดเลือดกับสิ่งแปลกปลอมได้คือทำหน้าที่เป็นออพโซนินนั่นเอง จากการศึกษาของ Takahashi และคณะ (1986) พบว่าหน้าที่ของเอนโดจีนัส กาแลคโตส บายดิ้ง เลคติน (endogeneous galactose binding lectin) จากน้ำเลือดของแมลง พบว่ามีการสังเคราะห์เลคตินชนิดนี้ใน 2 ช่วงเวลาคือ 1. ระหว่างช่วงที่มีการพัฒนาในระยะตัวอ่อน และ 2. อยู่ในระยะดักแด้ (pupal) หรืออาจมีการสร้างเลคตินในช่วงที่ร่างกายมีการบาดเจ็บ ดังนั้นเลคตินจึงมีหน้าที่ใน 2 ช่วงคือ ช่วงที่หนึ่งช่วยกำจัดเซลล์ที่ไม่ต้องการในระหว่างกระบวนการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (metamorphosis) และช่วงที่สองทำหน้าที่ในการป้องกัน

การติดเชื้อต่างๆ ได้ เลคตินมีความสำคัญในสัตว์จำพวกกุ้งและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังชนิดอื่นๆโดยหน้าที่ของเลคตินเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายตัวอย่างเช่น ไลโปพอลิแซคคาไรด์ บายดิ้ง โปรตีน (เลคติน) ที่แยกให้บริสุทธิ์จากแมลงชนิดหนึ่งโดยทำหน้าที่ในการดักจับแบคทีเรียภายในน้ำเลือด (Jomori *et al.*, 1990) และโปรตีนที่สามารถเชื่อมต่อกับ fungal β-1,3-glucan ที่ทำการแยกจากแมลง 2 ชนิด และจากกุ้งน้ำจืด 1 ชนิดพบว่าพวกโปรตีนของทั้งหมดนี้เป็นตัวชักนำโดยตรงให้เกิดการตอบสนองของโฮสท์ (host) โดยเริ่มต้นจากการกระตุ้นระบบโปรพีโอ หลังจากมีการเชื่อมต่อกับ β-1,3-glucan ซึ่งโปรตีนนี้ก็คือเลคติน การแยกเลคตินบริสุทธิ์นั้นในปัจจุบันสามารถแยกได้จากกุ้งกุลาดำ โดยเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 420 KD และมี 27 KD Subunit โดยมีกรดเอ็นอะซิติลนิวรามินิค (N-acetylneuraminic acid) เป็นตัวยับยั้งน้ำตาล (inhibitory sugar) (Jomori *et al.*, 1990)

6. **โปรฟีนอลออกซิเดส แอคทิเวติ้ง ซีสเตม**

เอนไซม์ชนิดนี้ส่งผลให้เกิดกระบวนการเมลาไนซ์เซชั่น (melanization) ตอบสนองต่อปรสิตที่เข้ามาภายในร่างกาย พบระบบนี้ทั้งในสัตว์จำพวกกุ้งและจำพวกแมลง Unstrem และ Soderhall (1977) พบว่า แอคทิวิตี้ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity) สามารถเพิ่มมากขึ้นโดย β-1,3-glucan ที่ทำหน้าที่คล้ายตัวกระตุ้นระบบโปรพีโอนั้นมีกลูโคส 5 ตัว หมายความว่า พวกโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) ที่ประกอบไปด้วยกลูโคส 5 หน่วยของ (1→3) เชื่อมกับ β-D-glucopyranosyl residues จะสามารถชักนำให้เกิดการกระตุ้นระบบโปรพีโอได้ แต่ถ้าโอลิโกแซคคาไรด์มีกลูโคสจำนวนน้อยก็จะไม่สามารถกระตุ้นได้ นอกจาก β-1,3-glucan แล้ว พวก microbialpolysaccharides ต่างๆ เช่น ไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ และเพปทิโดกลัยแคน (peptidoglycan) ก็สามารถกระตุ้นระบบโปรพีโอได้เช่นกัน จากการทดลองของ Johansson และ Soderhall (1989) และการทดลองของ Barracco และ Soderhall (1991) (อ้างโดย Soderhall and Cerenius, 1992) สนับสนุนแนวความคิดที่คาดว่าระบบโปรพีโอ ทำหน้าที่เหมือนเป็นระบบความจำ สิ่งที่กำลังเป็นที่น่าสนใจขณะนี้คือ หน้าที่ของระบบโปรพีโอในการติดต่อระหว่างเซลล์ในร่างกายของสัตว์

ชีวเคมีของระบบโปรพีโอ (biochemistry of the proPO-system)

หลังจากการแยกระบบโปรพีโอจากแมลงพบว่ามีโปรตีน 2 ชนิดคือโปรฟีนอลออกซิเดส (prophenoloxidase) และ β-1,3-glucan binding protein โดย โปรฟีนอลออกซิเดสมีน้ำหนัก 80 KD เอนไซม์โปรฟีนอลออกซิเดสจะถูกย่อยออกเป็นหน่วยเล็กๆ โดย commercial proteinase หรือจาก serine proteinase ที่แยกจาก cuticle ของแมลงชนิดนี้ ส่วนโปรฟีนอลออกซิเดสบริสุทธิ์ที่แยกจากเม็ดเลือดของกุ้งน้ำจืดมีน้ำหนัก 76 KD เป็นพอลิเพปไทด์ โดยมี serine proteinase ทำหน้าที่ย่อยเอนไซม์โปรฟีนอลออกซิเดสให้กลายเป็นฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase) โดยถ้าเอนไซม์โปรฟีนอลออกซิเดสถูกย่อยด้วย serine proteinase จะได้เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสขนาด 60 และ 62 KD แต่ถ้าถูกย่อยด้วย commercial trypsin จะได้เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสขนาด 60 KD ดังนั้นสรุปได้ว่า ระบบโปรพีโอในสัตว์จำพวกกุ้งจะมีการเปลี่ยนแปลงให้อยู่ในรูปของ active form คือ เอนไซม์โปรฟีนอลออกซิเดสจะถูกย่อยให้กลายเป็นเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสโดย endogeneous serine proteinase.

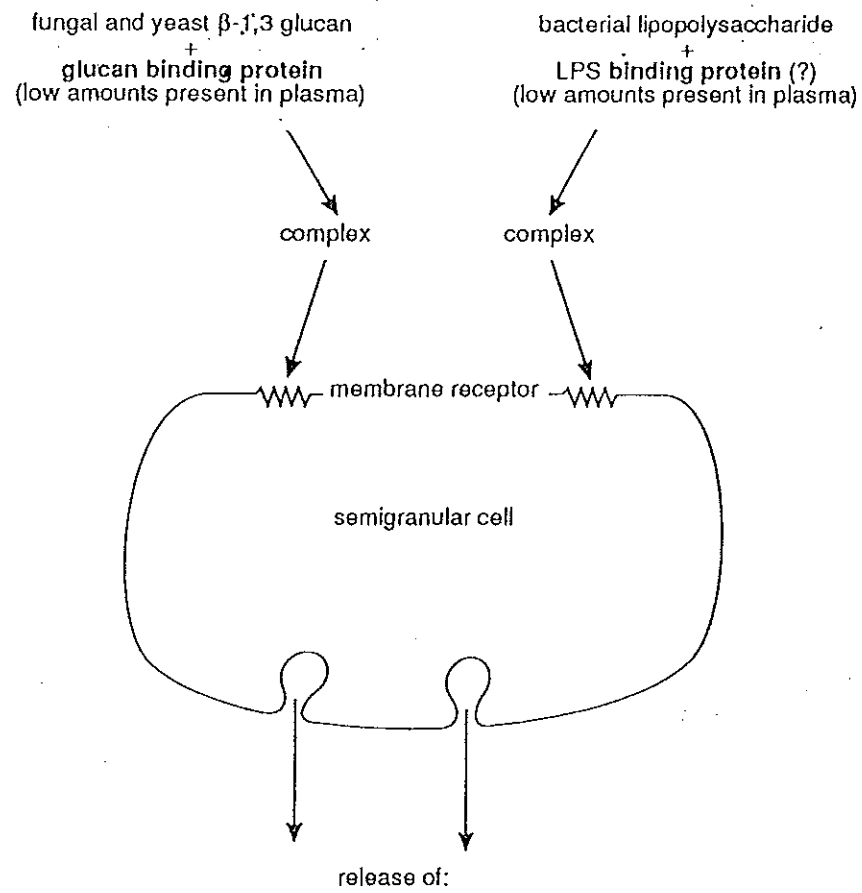
ในสัตว์จำพวกกุ้งระบบโปรพีโอสามารถที่จะเปลี่ยนแปลงไปเป็นรูปแบบที่ active ได้เลย โดยไม่มี microbial polysaccharide มากระตุ้นถ้าระดับแคลเซี่ยมไอออนในเลือดต่ำ ซึ่งคาดว่าจะเป็นประโยชน์เมื่อมีการเกิดบาดแผลและเกิดการแข็งตัวของเลือดขึ้น

กระบวนการเริ่มต้นของ proPO-system activation

เริ่มต้นโดยเกิดการกระตุ้นระบบให้อยู่ในรูปแอคทีฟโดย microbial polysaccharide เช่น เพปทิโดกลัยแคน ไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ และ β-1,3-glucan โดยสารคาร์โบไฮเดรตเหล่านี้จะกระตุ้นที่ฮีโมลิมพ์ (haemolymph) จึงเกิดการเชื่อมต่อของ β-1,3-glucan และ β-1,3-glucan binding protein จากนั้นก็จะเกิดเป็น complex แล้วจะไปกระตุ้นที่ membrane receptor ของ เซมิแกรนูลาร์เซลล์ ทำให้เกิดการหลั่งสารต่างๆออกมา (ภาพที่ 4) แล้วเปลี่ยนฟีนอล (phenol) ให้เป็นควิโนน (quinone) เพื่อสร้างเป็นเม็ดสีดำในที่สุด (ภาพที่ 5) (Knaap, 1993) และจากนั้นก็มีการกระตุ้นให้มีการหลั่งสารต่างๆ จากเซลล์เม็ดเลือดอย่างต่อเนื่อง (ภาพที่ 6) จากการศึกษาของ Kondo และคณะ (1992) พบว่า serine protease และ copper enzyme ชักนำให้เกิดการหลั่งเอนไซม์อย่างต่อเนื่องของ activating system

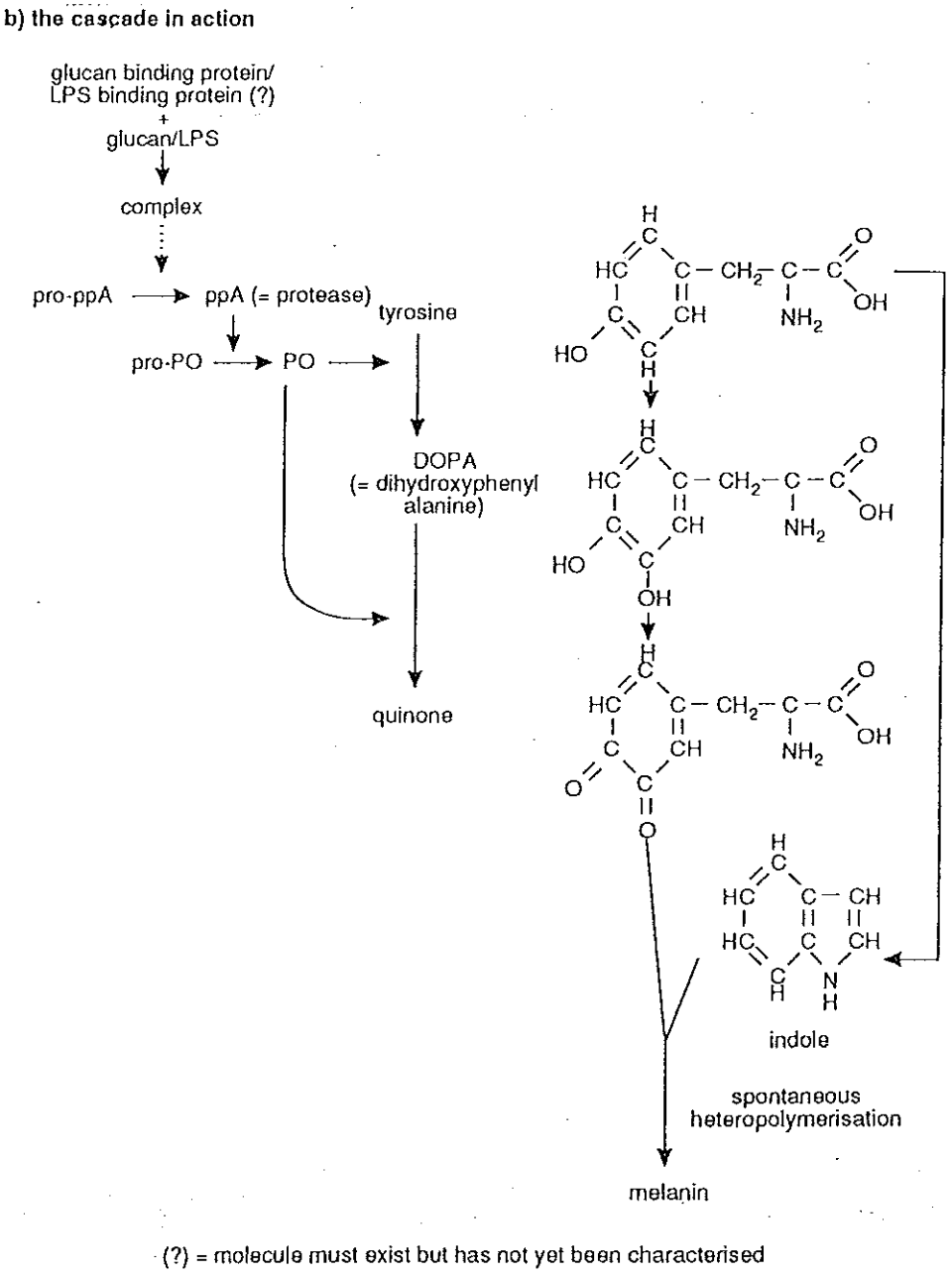
กระบวนการในระบบ ProPO

a) activation of the cascade



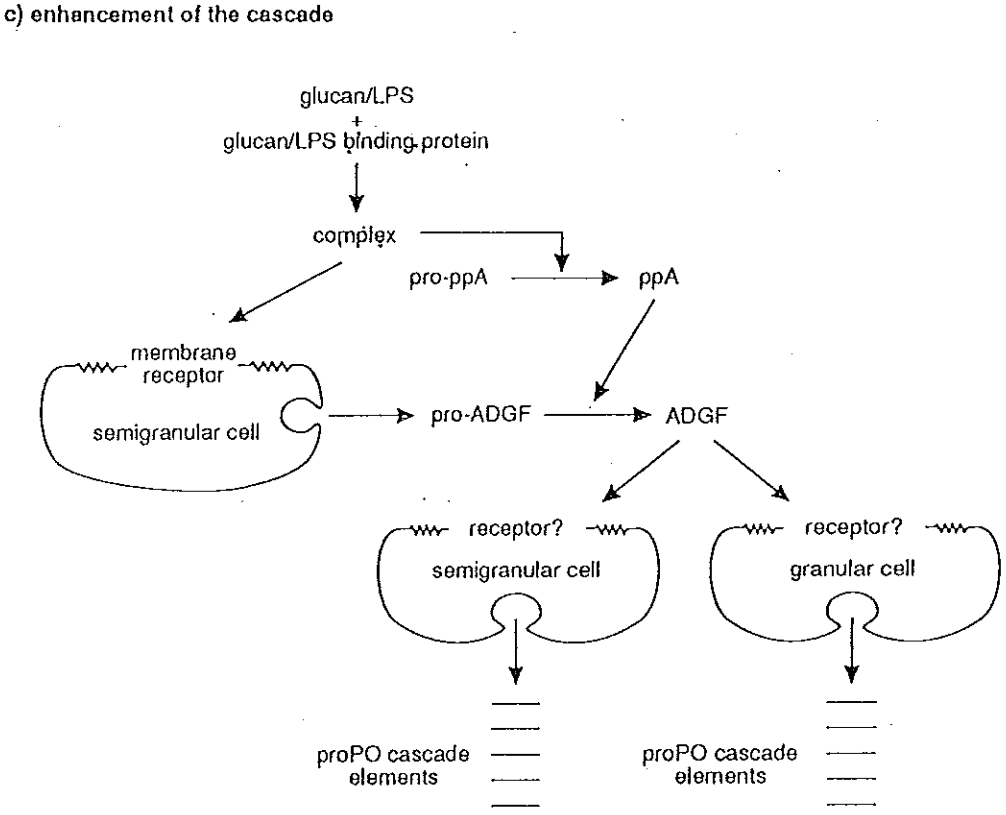
ภาพที่ 7 เริ่มต้นจากการที่เกิดการกระตุ้นระบบให้อยู่ในรูปแอคทีฟโดย microbial polysaccharide เช่น เพปทิโดกลัยแคน,ไลโปพอลิแซคคาไรด์และ β-1,3-glucan ซึ่งสารคาร์โบไฮเดรตเหล่านี้จะกระตุ้นที่ฮีโมลิมพ์ (haemolymph) จึงเกิดการเชื่อมต่อของ β-1,3-glucan และ β-1,3-glucan binding protein จากนั้นก็จะเกิดเป็น complex แล้วจะไปกระตุ้นที่ membrane receptor ของเซมิแกรนูลาร์ เซลล์ทำให้เกิดการหลั่งสารต่างๆ ออกมา

ที่มา : Knaap, 1993



ภาพที่ 8 สารที่หลั่งออกมาคือ เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสจะทำให้ เกิดการออกซิไดส์สาร ฟีนอลให้เป็นควิโนนแล้วจึงเปลี่ยนไปเป็นเมลานิน (malanin) ซึ่งจะทำหน้าที่ ยับยั้งการเจริญของเชื้อโรค

ที่มา : Knaap, 1993



ภาพที่ 9 สาร ADGF ที่หลั่งมาจากเซมิแกรนูลาร์ในขั้นตอนแรกจะทำหน้าที่ในการกระตุ้นเซมิแกรนูลาร์และแกรนูลาร์ให้มีการหลั่งสารในระบบโปรพีโอย่างต่อเนื่อง

ที่มา : Knaap, 1993

แอนตีไมโครเบียล คอมพาวด์ (antimicrobial compound)

ขั้นตอนสุดท้ายของระบบโปรพีโอ คือ การหลั่งเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส โดยเอนไซม์นี้จะออกซิไดส์ ฟีนอลให้เป็นควิโนนซึ่งเป็นรูปแบบหนึ่งของเมลานินที่จะไม่ได้รับการกระตุ้นจากเอนไซม์ใดๆ อีก เมลานินและสารตัวกลาง (intermediates) ของมัน เป็นสารประกอบที่เกิดปฏิกิริยาได้หลายอย่าง (Soderhall, 1982 อ้างโดย Soderhall and Cerenius, 1992) เช่นชักนำให้เกิดการป้องกันไม่ให้เกิดการเจริญของจุลชีพโดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่หลั่งออกมาจากจุลชีพ เช่น โปรทิเนส (proteinase) และ ไคติเนส (chitinases) (Kuo and Alexander, 1967 อ้างโดย Soderhall and Cerenius, 1992)

4. การใช้วัคซีนในกุ้งกุลาดำ

กิจการ ศุภมาตย์ และ สิทธิ บุณยรัตผลิน (2538) ได้ทำการทดลองให้วัคซีนเชื้อ *Vibrio* sp. แก่กุ้งกุลาดำโดยวิธีการแช่ พบว่าหลังจากแช่วัคซีนเป็นเวลา 10 วัน ค่าความว่องไวของเม็ดเลือดกุ้งในการจับกินสิ่งแปลกปลอมมีค่าเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย และกุ้งทดลองที่ให้วัคซีนแบบแช่นั้นพบว่าไม่มีความต้านทานต่อเชื้อไวรัสหัวเหลือง โดยให้ผลอัตราการตายใกล้เคียงกับในชุดควบคุม หลังจากฉีดเชื้อเป็นเวลา 7 วัน ค่าความว่องไวของเม็ดเลือดกุ้งที่ได้รับวัคซีนจะสูงกว่ากุ้งปกติเพียงเล็กน้อย

Itami และ Takahashi (1991) ทดลองนำ killed Vibrio cell มาผสมใน micro-encapsulated diet สำหรับลูกกุ้งกุลาดำ โดยนำ killed Vibrio cell มาผสมในระดับ 0.05, 0.5 และ 5 เปอร์เซ็นต์ แล้วเคลือบด้วย gelatin โดยวิธี spray- dry พบว่าอัตราการรอดตายของลูกกุ้งทดลองที่ได้รับอาหารที่ผสม killed Vibrio cell สูงกว่าในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการผสม killed Vibrio cell ลงในอาหาร ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.01$) แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างทั้ง 3 ระดับ พบว่าอาหารที่ได้รับการผสม killed Vibrio cell ที่ 0.05, 0.5 และ 5 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดตาย 39, 28 และ 25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Itami และคณะ (1992a,b) ได้ทำการศึกษาถึงประสิทธิภาพของวัคซีนที่ป้องกันโรควิบริโอซิส (Vibriosis) โดยใช้วัคซีนชนิด formalin killed *Vibrio* sp. NU-1 ทดสอบโดยการแช่กุ้งลงในวัคซีนความเข้มข้น 10, 1, 0.5 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ vaccine solution เป็นเวลา 5 ชั่วโมง หลังจากนั้น 2 อาทิตย์ นำกุ้งไปแช่เชื้อ *Vibrio* sp. NU-1 พบว่าที่ 1 เปอร์เซ็นต์ vaccine solution มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคได้ดีที่สุดคือ 50 วัน หลังจากแช่วัคซีน จากนั้นได้ทำการทดลองถึงเรื่องการเตรียมวัคซีนในรูปแบบต่างๆ คือ whole vaccine (วัคซีนที่ใช้เชื้อทั้งตัว) cell free vaccine (วัคซีนที่ใช้เชื้อที่ได้จากการปั่นแยกแล้วกรองเอาเฉพาะส่วนน้ำใส) cell vaccine (วัคซีนที่ใช้เชื้อที่ได้จากการปั่นแยกโดยไม่ต้องมีการกรอง) ultrasonicated vaccine (วัคซีนที่มีการใช้เสียงอัลทราโซนิกส์ทำให้เซลล์แตกออกเป็นชิ้นส่วนต่างๆเช่น ส่วนของผนังเซลล์ ไซโทพลาสมิก เมมเบรน ฯ) และ heat killed vaccine (วัคซีนที่มีการฆ่าเชื้อให้ตายด้วยความร้อน) เพื่อทดสอบว่าวัคซีนแบบใดที่จะมีประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดโรค Vibriosis ได้ดีที่สุด โดยทำการแช่กุ้งในสารละลายวัคซีนเข้มข้น

10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที พบว่าวัคซีนแบบ ultrasonicated vaccine cell vaccine heat-killed vaccine และ cell-free vaccine มีประสิทธิภาพในการป้องกันการติดเชื้อได้ดีตามลำดับ

Itami และคณะ (1989) ศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีน ในการป้องกันการเกิดโรค Vibriosis ในกุ้ง Kuruma (*P. japonicus*) โดยขั้นตอนแรกของการทดลองคือ การผลิตวัคซีน ทำโดยหา Lethal dose คือ ระดับความเข้มข้น (dose) ของเชื้อที่ทำให้สัตว์ที่ได้รับเกิดการตายโดยใช้ *Vibrio* sp. NU-1 ที่เป็นสาเหตุของโรค Vibriosis ในกุ้ง Kuruma ส่วนการหา LD_{50} คือ ระดับความเข้มข้นของเชื้อ ที่ทำให้สัตว์ทดลองที่ติดเชื้อ *Vibrio* sp.NU-1 ตายเป็นจำนวนครึ่งหนึ่งของจำนวนสัตว์ทดลองทั้งหมด ทดสอบโดยใช้กุ้ง 10 ตัว (น้ำหนักเฉลี่ยตัวละ 20 g) บ่มเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ให้เจริญที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง ใน Nutrient Broth ที่มีน้ำทะเลปลอดเชื้อผสม 50 เปอร์เซ็นต์ ทำการเจือจางเชื้อจาก 3.7×10^5 cell/ml เป็น 3.7×10^1 cell/ml โดยทำในน้ำที่ผสมน้ำทะเลปลอดเชื้อ 50 เปอร์เซ็นต์ นำเชื้อที่มีความเข้มข้นแต่ละระดับมาให้แก่กุ้งแต่ละกลุ่มๆ ละ 10 ตัว โดยวิธีการฉีดเชื้อปริมาณ 0.1 ml เข้าไปบริเวณกล้ามเนื้อท้องปล้องที่ 6 กุ้งที่ถูกฉีดเชื้อนี้ ให้อยู่ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และให้อาหารทุกวัน บันทึกอัตราการตายเป็นเวลา 10 วัน ค่า LD_{50} คำนวนโดยวิธีของ Behrens-Karber Method นำเชื้อ *Vibrio* sp. NU-1 มาบ่มใน Nutrient Broth ที่มีมีน้ำทะเลปลอดเชื้อผสม 50 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่า ได้เซลล์จำนวน 9.5×10^9 cell/ml ฆ่าเชื้อแบคทีเรียโดยใช้ฟอร์มาลิน 0.5 เปอร์เซ็นต์และทำการให้วัคซีนแก่สัตว์ทดลองกลุ่มต่างๆกลุ่มละ 8-11 ตัว โดยวิธีต่างๆ 1 ใน 3 วิธี คือ วิธีการฉีด การแช่ และการสเปรย์ การฉีดทำโดยฉีด 0.1ml ของ NU-1 vaccine ให้แก่กุ้งแต่ละกลุ่ม โดยฉีดเข้าบริเวณท้องปล้องที่ 6 วิธีการแช่ทำโดยแช่กุ้งลงในสารละลายวัคซีนเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง วิธีการสเปรย์ทำโดยสเปรย์วัคซีนผ่านตาข่ายลงไปที่ตัวกุ้ง กุ้งทดลองทุกตัวทำการเลี้ยงในตู้กระจกที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียสและให้กินอาหารทุกวัน จากนั้นนำไปทดสอบความต้านทานเชื้อ โดยนำกุ้งทดลองมาทำการติดเชื้อหลังจากได้รับวัคซีนเป็นเวลา 30 วัน โดยวิธีการฉีดเชื้อ *Vibrio* sp. NU-1 เข้าภายในกล้ามเนื้อท้องปล้องที่ 6 ระดับความเข้มข้นของเชื้อที่ใช้ในการฉีดพิจารณาจากค่า LD_{50} โดยใช้เชื้อเข้มข้น 1.9×10^3 - 2.6×10^3 1cell/กุ้ง 1 ตัว เชื้อที่ใช้แยกจาก lymphoid organ และกล้าม

เนื้อของกุ้งที่ตายจากโรค Vibriosis จากนั้นทำแอนติซีรั่มของกระต่าย โดยฉีดเชื้อ *Vibrio* sp. NU-1 ที่ผสม freund complete adjuvant เข้าไปในกระต่าย 3 ครั้ง ภายใน 2 สัปดาห์ จากนั้นดูดเลือดกระต่ายจากบริเวณ marginal ear vein นำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 5,000 รอบ/นาทีเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก็จะได้ Anti Vibrio serum ซึ่งผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของเชื้อแต่ละระดับที่ฉีดเข้าไปในกุ้งทดลองทำให้กุ้งเริ่มตายเนื่องจากค่า LD_{50} ที่คำนวนได้มีค่าน้อยกว่า 3.2×10^{2} cell/กุ้ง 1 ตัว แต่ dose ที่ใช้ทดสอบความต้านทานเชื้อโรคนี้ คือ $1.9\text{-}2.6 \times 10^{3}$ cell/ กุ้ง 1 ตัว ซึ่งถ้ากุ้งสามารถทนต่อเชื้อที่มีความเข้มข้นมากกว่า LD_{50} ได้ ก็แสดงว่าวัคซีนที่ใช้ในการทดลองมีประสิทธิภาพในการป้องกันการติดเชื้อโรค อัตราการตายอย่างต่อเนื่องของกลุ่มที่ได้รับวัคซีนจะน้อยกว่าในกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน (กลุ่มควบคุม) และหลังจากการติดเชื้อ 10 วัน การตายของกุ้งในกลุ่มที่ได้รับวัคซีนน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของกลุ่มควบคุม ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่ไม่พบว่ามีความแตกต่างระหว่างวิธีการให้วัคซีน ทั้งวิธีการฉีด การแช่ และ การสเปรย์ ทำการตรวจสอบว่าเชื้อที่ทำให้กุ้งตายคือ *Vibrio* sp. NU-1 ทดสอบโดยการแยกเชื้อแบคทีเรีย มาจาก lymphoid organ และกล้ามเนื้อของกุ้งที่ทดลองที่ตาย ทดสอบปฏิกิริยาเกาะกลุ่มกับ anti Vibrio serum ของกระต่าย ซึ่งก็พบว่าเกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่มขึ้นบนสไลด์ที่ทดสอบนั่นคือกุ้งทดลองเหล่านี้ตายเนื่องมาจากเชื้อ *Vibrio* sp. NU-1 ดังนั้นจากการทดลองนี้จึงสรุปได้ว่าการให้วัคซีนทั้งแบบวิธีการฉีด การแช่ และการสเปรย์ สามารถป้องกันการติดเชื้อ *Vibrio* sp. NU-1 ที่ใช้ในการทดลองของกุ้ง kurumaได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาวิธีการผลิตวัคซีนจากเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi*
2. เพื่อศึกษาวิธีการใช้วัคซีนที่ผลิตได้ในกุ้งกุลาดำ
3. เพื่อศึกษาวิธีการตรวจสอบประสิทธิภาพของวัคซีน

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

1. สัตว์ทดลอง

กุ้งกุลาดำอายุ 2-3 เดือน น้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 15-20 กรัม

2. อาหารกุ้งกุลาดำ

3. เชื้อแบคทีเรีย

เชื้อ *V. harveyi* ที่แยกจากกุ้งที่ป่วยเป็นโรคเรืองแสง เก็บรักษาในอาหารวุ้นเอียง Tryptic Soy Agar (TSA) ถ่ายเชื้อทุก 2 เดือน

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย เช่น Thiosulfate Citrate Bile Salt (TCBS), Tryptic Soy Agar (TSA), Tryptic Soy Broth (TSB), Muller Hinton Agar (MH) และ Plate Count Agar (PCA) และ อาหารทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี api 20 E (bioMe'rieux sa)

5. อาหารเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือด

อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือด เช่น K-199 และ KR-199 องค์ประกอบของอาหารดังรายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก

6. สารเคมี

สารเคมีระดับ analytical grade ใช้ในการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ และใช้ในการวิเคราะห์ แอคทิวิตี้ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ปริมาณซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน ค่าความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือด

6. วัสดุอื่นๆ

เครื่องแก้ว ประกอบด้วย จานเพาะเลี้ยง ไปเปตต์ หลอดทดลอง หลอดเซนตริฟิวจ์ ฟลาส์ก และไมโครปิเปตต์

อุปกรณ์

1. เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ
2. สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)
3. เครื่องอัลตร้าโซนิกส์ ฮอโมจิไนซ์เซอร์ (ultrasonics homoginizer) (Cole Parmer CP 501)
4. เครื่องมือวัดความเป็นกรด-ด่าง
5. ELISA (enzyme-linked immonusorbent assay) reader
6. ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
7. ตู้กระจกขนาด 60x122x32.5 เซนติเมตร
8. กล้องจุลทรรศน์และฮีมาโตไซโทมิเตอร์ (haematocytometer)
9. เครื่องแช่แข็งแห้ง
10. หม้อนึ่งไฟฟ้าอัตโนมัติ

วิธีการ

1. **การผลิตวัคซีน**

1.1 วิธีการแยกเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์

วิธีการแยกเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์ ทุกขั้นตอนจะต้องทำด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic tecnique) โดยทำการแยกเชื้อแบคทีเรียเรืองแสง (*V. harveyi*) จากกุ้งกุลาดำ โดยเช็ดบริเวณตัวของกุ้งกุลาดำด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นใช้ลูปซึ่งฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงไปที่บริเวณที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียเช่น บริเวณตับอ่อน (hepatopancrease) หัวใจ และลิมฟอยด์ (lymphoid) แล้วนำไปเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ

ห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากนั้นนำเชื้อจากกลุ่ม (colony) เดี่ยวซึ่งเป็นเชื้อที่บริสุทธิ์มาศึกษาลักษณะทางสันฐานวิทยาลักษณะการเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อและลักษณะทางสรีรวิทยาและนำเชื้อบริสุทธิ์มาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (MacFaddin, 1980) โดยทำการทดสอบเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase test) ทดสอบการใช้คาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ อะราบิโนส กลูโคส มอลโตส แมนนิทอล ซูโครส ดูลซิโทล แลคโตส กาแลคโตส แมนโนส ทดสอบการสร้างเอนไซม์อะไมเลส เจลลาติเนส ไคติเนส ทดสอบอาร์จีนีน ไดไฮโดรเลส (arginine dihydrolase) ทดสอบดีคาร์บอกซิเลส 2 ชนิดคือ ไลซีน (lysine) และ ออร์นิทีน (ornithine) ทดสอบการสร้างอินโดล (indole) ทดสอบการเจริญเติบโต ที่อุณหภูมิ 4 และ 35 องศาเซลเซียส และทดสอบการเจริญเติบโตใน NaCl ที่ระดับ:0, 3, 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นแยกชนิดของเชื้อตามขั้นตอนของ Baumann และคณะ (1984)

1.2 **ทดสอบความรุนแรงของเชื้อ** *V. harveyi* (ดัดแปลงจาก Vera *et al.*, 1992)

นำเชื้อ *V. harveyi* บริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth ที่บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมาเหวี่ยงให้ตกตะกอนโดยใช้ความเร็ว 2832.4 g เป็นเวลา 10 นาที นำเชื้อที่ได้มาเจือจางให้ได้ระดับความเข้มข้นต่างๆ นำไปวัดค่าความทึบแสง (optical density ; OD) ที่ 610 nm แล้วเทียบปริมาณเชื้อแบคทีเรียกับกราฟมาตรฐานของเชื้อ *V. harveyi* (ภาคผนวก ค) จากนั้นนำกุ้งกุลาดำที่มีขนาดประมาณ 15-20 กรัม จำนวน 50 ตัว ทำการฉีดเชื้อในระดับต่างๆที่เตรียมไว้ โดยใช้กุ้งทดลองระดับละ 10 ตัว โดยจะฉีดเชื้อเข้าที่บริเวณกล้ามเนื้อของท้องปล้องที่ 6 ในปริมาณ 0.1 ml ของความเข้มข้นแต่ละระดับ ส่วนในกลุ่มควบคุมมี 2 กลุ่ม กลุ่มหนึ่งให้ฉีดน้ำเกลือปลอดเชื้อ (NaCl 0.85 เปอร์เซ็นต์) ส่วนอีกกลุ่มหนึ่งไม่ต้องฉีดสารใดๆปล่อยกุ้งทดลองในน้ำที่มีความเค็ม 20 ส่วนในพันส่วน ที่อุณหภูมิประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส บันทึกเวลาและจำนวนกุ้งที่ตาย แล้วนำผลมาคำนวณหาค่า LD_{50} ตามวิธีของ Reed และ Muench (1938) (ภาคผนวก ค) นำเชื้อแบคทีเรียจากตับและจากกล้ามเนื้อบริเวณปล้องท้องของกุ้งที่มีอาการป่วยมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์และตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อที่แยกออกมาว่าเป็นเชื้อ *V. harveyi*

1.3 **ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อโดยวิธี** Disc Diffusion Method (MacFaddin, 1980) วิธีการทดสอบแสดงในภาคผนวก ข

1.4 **วิธีการนำเชื้อไปผลิตวัคซีน** (ดัดแปลงจาก Taku and Fan, 1979)

นำเชื้อ *V. harveyi* บริสุทธิ์มาบ่มในอาหาร Tryptic Soy Broth ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมงบนเครื่องเขย่า จากนั้นนำไปเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 5664.8 g เป็นเวลา 10 นาที นำตะกอนที่ได้ไปละลายในน้ำเกลือปลอดเชื้อ จากนั้นนำสารละลายเชื้อแบคทีเรียไปทำให้เซลล์แตก โดยใช้เครื่อง อัลทราโซนิกส์ ฮอโมจิไนซ์เซอร์ จากนั้นทดสอบการปลอดเชื้อ (sterile) ของวัคซีนโดยเกลี่ยเชื้อจากสารละลายเชื้อแบคทีเรียหลังจากทำให้เซลล์แตกลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA บ่มเชื้อทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของเชื้อบนอาหาร เพื่อทดสอบว่าเชื้อที่นำมาทำวัคซีนเซลล์แตกและไม่สามารถเจริญได้ แล้วจึงนำสารละลายเชื้อที่ทำให้เซลล์แตกแล้วไปทำการแช่แข็งแห้ง เพื่อทำเป็นวัคซีนผง เมื่อต้องการนำวัคซีนมาใช้ให้ละลายผงวัคซีนในน้ำเกลือปลอดเชื้อ

2. **ศึกษาวิธีการให้วัคซีนและปริมาณที่เหมาะสมต่อกุ้งกุลาดำ**

วิธีการให้วัคซีนแก่กุ้งกุลาดำเพื่อเพิ่มระดับภูมิคุ้มกันในร่างกายของกุ้งในระดับห้องปฏิบัติการ มีวิธีการให้วัคซีน 3 วิธี ซึ่งใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design;CRD) ชุดการทดลองละ 120 ตัวและวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Duncan, 1955)

2.1 **การให้วัคซีนด้วยวิธีการกิน**

นำตู้กระจกขนาด 60 x 122 x 32.5 เซนติเมตร จำนวน 24 ตู้มาทำความสะอาดและติดตั้งหินให้ออกซิเจนและใส่ท่อพลาสติกเป็นท่อนขนาดความยาว 5-6 นิ้วเพื่อเป็นที่หลบซ่อนของกุ้ง และแบ่งหนึ่งตู้เป็น 5 ช่องโดยนำแผ่นกระจกใสมากั้นตู้ตามขวางโดยเลี้ยงกุ้งช่องละ 2 ตัว ใส่น้ำทะเลผสมกับน้ำจืดให้มีระดับความเค็มประมาณ 20-25 ส่วนในพันส่วนและอุณหภูมิของน้ำประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส เลือกขนาดของกุ้งกุลาดำที่ใช้ทดลองให้มีน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 15-20 กรัม/ตัว จำนวน 20 ตัว/1 ตู้ ให้อาหารกุ้งวันละ 4 ครั้ง วันละ 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว ให้อาหารกุ้งห่างกันในแต่ละมื้อประมาณ 6 ชั่วโมง ทำความสะอาดตู้โดยการดูดตะกอนและอาหารที่เหลือออกจากตู้และถ่ายน้ำใหม่ทุกวัน ผสมอาหารกับวัคซีนที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักอาหาร

โดยชุดการทดลองที่ 1 เป็นชุดควบคุม ชุดการทดลองที่ 2 ผสมวัคซีนที่ระดับความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ชุดการทดลองที่ 3 ผสมวัคซีนที่ระดับความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ และชุดการทดลองที่ 4 ผสมวัคซีนที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักอาหาร จากนั้นทำการให้อาหารแก่กุ้งทดลองคือ ให้กุ้งทดลองกินอาหารผสมวัคซีนแต่ละระดับติดต่อกันเป็นเวลา 30 วัน หลังจากให้กุ้งทดลองกินอาหารผสมวัคซีนแล้ว จะทำการเก็บตัวอย่างเลือดในวันที่ 10, 20 และ 30 วันนับจากวันที่เริ่มให้กิน เพื่อนำไปวิเคราะห์ค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity) (ดัดแปลงจาก Soderhall *et al.*, 1988) ปริมาณการผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน (superoxide anion) ของเม็ดเลือด (ดัดแปลงจาก Bell and Smith, 1993) ค่าความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือด (clearance of bacteria) (ดัดแปลงจาก Martin *et al.*, 1993) และทดสอบความต้านทานเชื้อ *V. harveyi* โดยในแต่ละครั้งของการเก็บตัวอย่างเลือดจากกุ้งจะใช้กุ้งทดลองชุดการทดลองละ 40 ตัว โดยแบ่งใช้ วิเคราะห์วิธีละ 10 ตัว และกุ้งทดลองที่ถูกเก็บตัวอย่างเลือดแล้วจะไม่นำมาใช้อีกในการวิเคราะห์ครั้งต่อไปจะใช้กุ้งทดลองชุดใหม่ที่เริ่มเลี้ยงพร้อมกัน รายละเอียดของวิธีการวิเคราะห์พารามิเตอร์ดังกล่าวแสดงในภาคผนวก ข

2.2 การให้วัคซีนด้วยวิธีการแช่

คัดเลือกขนาดและจัดการการเลี้ยงกุ้งเช่นเดียวกับวิธีข้อ 2.1 แต่ใช้ตู้กระจก 12 ตู้ จากนั้นทำการแช่กุ้งกุลาดำลงในวัคซีนเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ และนำวัคซีนมาใช้ในอัตราส่วนระหว่างวัคซีนต่อน้ำเป็น 1:250 เป็นการแช่โดยตรง (direct immersion) แช่เป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วจึงนำกุ้งที่แช่วัคซีนแล้วเลี้ยงในตู้กระจกที่เตรียมไว้ โดยหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 14 วันจะทำการแช่วัคซีนในความเข้มข้นระดับเดิมซ้ำอีกครั้ง หลังจากทำการแช่วัคซีนแล้วทำการเลี้ยงกุ้งต่อในตู้กระจกที่เตรียมไว้เป็นเวลาประมาณ 30 วันโดยจะเก็บตัวอย่างเลือดในวันที่ 10, 20 และ 30 วันนับจากวันที่เริ่มแช่วัคซีนครั้งแรก เพื่อนำไปวิเคราะห์ค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ปริมาณการการผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน ของเม็ดเลือด ความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือด และทดสอบความต้านทานเชื้อด้วยวิธีการตามข้อ 2.1

2.3 การให้วัคซีนด้วยวิธีการฉีด

คัดเลือกขนาดและจัดการการเลี้ยงกุ้งเช่นเดียวกับวิธีข้อ 2.1 แต่ใช้ตู้กระจกจำนวน 18 ตู้ ฉีดวัคซีนเข้าไปที่บริเวณกล้ามเนื้อกุ้งโดยใช้ความเข้มข้น 0.1 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ ใน

บริเวณกล้ามเนื้อท้องปล้องสุดท้ายโดยฉีดในปริมาณตัวละ 0.1 ml เลี้ยงกุ้งทดลองที่ฉีดวัคซีนเป็นเวลา 30 วัน โดยจะเก็บตัวอย่างเลือดในวันที่ 10, 20 และ 30 วันนับจากวันที่เริ่มฉีด เพื่อนำไปวิเคราะห์ค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ปริมาณการผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน ของเม็ดเลือด ความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือด และทดสอบความต้านทานเชื้อด้วยวิธีการตามข้อ 2.1

บทที่ 3

ผล

1. การผลิตวัคซีน

1.1 ลักษณะของเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทำวัคซีน

หลังจากแยกเชื้อแบคทีเรียจากกุ้งที่ป่วยเป็นโรคเรืองแสง ทำการจำแนกชนิดของเชื้อว่าคือ *V. harveyi* โดยศึกษาลักษณะการเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางสรีรวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมี พบว่าลักษณะโคโลนีของเชื้อ *V. harveyi* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีลักษณะผิวหน้าเรียบ สีขาวนวลเป็นมันวาว โคโลนีกลมนูน เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีประมาณ 2-4 mm เรืองแสงสีเขียวในที่มืด เซลล์มีรูปร่างท่อน ติดสีแกรมลบ ผลทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีแสดงไว้ในตารางที่ 4

การทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *V. harveyi* หลังจากได้เชื้อ *V. harveyi* บริสุทธิ์แล้ว นำมาทดสอบความรุนแรงของเชื้อ โดยฉีดเชื้อที่ความเข้มข้นระดับต่างๆให้แก่กุ้งทดลอง บันทึกเวลาและจำนวนกุ้งที่ตายแล้วนำผลมาคำนวณค่า LD_{50} พบว่ามีค่าเท่ากับ 7.33×10^7 cell/ml หรือมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 610 nm เท่ากับ 0.093

การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ เมื่อนำเชื้อ *V. harveyi* มาทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ โดยใช้ยา 9 ชนิด พบว่าเชื้อ *V. harveyi* ที่แยกได้มีความไวต่อยาปฏิชีวนะคือ ซาราฟล็อกซาซิน นอร์ฟล็อกซาซิน ออกซี่เตตร้าซัยคลิน กานามัยซิน นีโอมัยซิน คลอแรมเฟนนิคัล ซัลฟา-ไตรเมธโธพริม และดื้อต่อยา ออกโซลินิค แอซิด ดังแสดงในตารางที่ 5

1.2 การนำเชื้อไปผลิตวัคซีน

หลังจากเก็บเซลล์จากเชื้อ *V. harveyi* ในอาหาร Tryptic Soy Broth ที่บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปทำให้เซลล์แตก จากนั้นนำเซลล์แบคทีเรียไปทำการแช่แข็งแห้งจะได้เป็นวัคซีนผง ดังภาพที่ 10

ตารางที่ 4 ผลทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อที่แยกจากกุ้งที่ป่วยเป็นโรคเรืองแสง

ลักษณะ	แยกเชื้อจากกุ้งที่ป่วยเป็นโรคเรืองแสง	*Vibrio harveyi*
oxidase test	+	+
motility	+	+
catalase	+	+
luminescence	+	+
ONPG hydrolysis	+	+
citrate	+	+
Arginine dihydrolase	-	-
Decarboxylase		
- ornithine decarboxylase	+	+
- lysine decarboxylase	+	+
enzyme production		
- amylase	+	+
- gelatinase	+	+
utilization of		
- glucose	+	+
- mannose	+	+
- arabinose	+/-	+/-
- galactose	-	+/-
- lactose	-	-
- moltose	+	+
- melibiose	-	-
- mannitol	+/-	+
- fructose	+	+
- sorbitol	-	-

+ = ให้ผลบวก - = ให้ผลลบ +/- = ผลไม่ชัดเจนระหว่างบวกและลบ

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ลักษณะ	แยกเชื้อจากกุ้งที่ป่วยเป็นโรคเรืองแสง	*Vibrio harveyi*
- sucrose	+	+
- rhamnose	-	-
growth on TCBS	+	+
growth at :		
- 0% NaCl	-	-
- 3% NaCl	+	+
- 6% NaCl	+	+
- 8% NaCl	-	+/-

+ = ให้ผลบวก - = ให้ผลลบ +/- = ผลไม่ชัดเจนระหว่างบวกและลบ

ตารางที่ 5 ความไวต่อยาชนิดต่างๆ ของ *V. harveyi* จากกุ้งที่เป็นโรคเรืองแสง

ชนิดของยา	ความเข้มข้นของยา (μg)	ผล
ซาราฟล็อกซาซิน	5	S
นอร์ฟล็อกซาซิน	10	S
อิริโทรมัยซิน	15	I
ออกซี่เตตร้าซัยคลิน	30	S
กานามัยซิน	30	S
นีโอมัยซิน	30	S
คลอแรมเฟ็นนิคัล	30	S
ซัลฟา-ไตรเมธโธพริม	25	S
ออกโซลินิค แอซิด	2	R

R= resistance S = susceptible I = intermediate

ภาพที่ 10 วัคซีนเชื้อเรืองแสงที่ได้จากการทำให้เซลล์แตกแล้วทำการแช่แข็งแห้ง

2. วิธีการให้และปริมาณวัคซีนที่เหมาะสมต่อกุ้งกุลาดำ

2.1 การให้วัคซีนด้วยวิธีการกิน

หลังจากให้กุ้งทดลองกินอาหารผสมวัคซีน 4 ระดับคือ 0 (ชุดควบคุม), 0.1, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักอาหาร จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ในวันที่ 10, 20 และ 30 วันนับตั้งแต่วันที่เริ่มให้กิน โดยการเก็บตัวอย่างแต่ละครั้งจะนำไปวิเคราะห์ค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส การผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน ของเม็ดเลือด ความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือด และทดสอบความต้านทานเชื้อ

2.1.1 ค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส

จากการทดลองพบว่า ค่าเฉลี่ยแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสของเม็ดเลือดกุ้งทั้ง 4 ชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ 10, 20 และ 30 วันหลังกินอาหารผสมวัคซีน (ตารางที่6)

2.1.2 การผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน ของเม็ดเลือด

ค่า ซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน ของเม็ดเลือด ที่ 10 วันพบว่า ชุดควบคุมและชุดที่กินอาหารผสมวัคซีน 0.1 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณของซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน ต่ำกว่าชุดที่กินอาหารผสมวัคซีน 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ที่ 20 วันพบว่าทั้ง 4 ชุดการทดลองมีความแตกต่างกันทางสถิติ และที่ 30 วันพบว่า ชุดควบคุม ชุดที่กินอาหารผสมวัคซีน 0.5 เปอร์เซ็นต์ และชุดที่กินอาหารผสมวัคซีน 1 เปอร์เซ็นต์ มีค่า ซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน ของเม็ดเลือด ที่แตกต่างกันทางสถิติ โดยชุดที่กินอาหารผสมวัคซีน 1 เปอร์เซ็นต์ มีค่าซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน สูงที่สุด และชุดที่กินอาหารผสมวัคซีน 0.5 เปอร์เซ็นต์และชุดควบคุมมีค่าต่ำลงมาตามลำดับ ส่วนชุดที่กินอาหารผสมวัคซีน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีความแตกต่างระหว่างชุดควบคุมและชุดที่กินอาหารผสมวัคซีน 0.5 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 7 และภาพที่ 11)

2.1.3 ค่าความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือด

ผลการทดลองพบว่าค่าความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือด เมื่อตรวจผลบนอาหาร PCA พบว่าทั้ง 4 ชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ 10 วัน ส่วนการวิเคราะห์ที่ 20 และ 30 วัน พบว่า ชุดควบคุมมีค่าความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือดต่ำกว่าชุดที่กินอาหารผสมวัคซีน 0.1, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

(ตารางที่ 8 และ ภาพที่ 12) ส่วนบนอาหาร TCBS พบว่าชุดควบคุมกับชุดที่กินอาหารผสมวัคซีน 0.1, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ 10, 20 และ 30 วัน (ตารางที่ 9 และ ภาพที่ 13)

2.1.4 ความต้านทานต่อเชื้อ *V. harveyi*

หลังจากฉีดเชื้อ *V. harveyi* ให้แก่กุ้งทดลองทั้ง 4 ชุด พบว่าที่ 10, 20 และ 30 วัน ค่า RPS (relative percent survival) ของชุดที่กินอาหารผสมวัคซีน 0.1 เปอร์เซ็นต์ มีผลให้อัตราการรอดตายเพิ่มมากขึ้น 40, 33.33 และ 60 เปอร์เซ็นต์ ชุดที่กินอาหารผสมวัคซีน 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีผลให้อัตราการรอดตายเพิ่มมากขึ้น 40, 50 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ส่วนค่า RPS ของชุดที่กินอาหารผสมวัคซีน 1 เปอร์เซ็นต์ มีผลให้อัตราการรอดตายเพิ่มมากขึ้น 40, 50 และ 60 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 10 และ ภาพที่ 14)

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (PO activity) ในเม็ดเลือดของกุ้งที่กินอาหารผสมวัคซีน 4 ระดับคือ 0, 0.1, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักอาหาร

จำนวนวันหลังได้รับวัคซีน	ค่า PO activity (unit/min/ mg protein)			
	ชุดควบคุม	ชุดที่กินอาหารผสมวัคซีน 0.1 %	ชุดที่กินอาหารผสมวัคซีน 0.5 %	ชุดที่กินอาหารผสมวัคซีน 1 %
10	219.02 ± 56.02	211.92 ± 35.05	225.42 ± 47.54	215.87 ± 60.08^{ns}
20	199.06 ± 45.93	235.05 ± 61.82	211.57 ± 73.31	205.71 ± 52.05^{ns}
30	165.46 ± 55.85	174.52 ± 25.75	181.57 ± 20.62	182.15 ± 33.72^{ns}

ns = non significant แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$)

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบปริมาณการผลิต ซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน (SO anion) ในเม็ดเลือดของกุ้งที่กินอาหารผสมวัคซีน 4 ระดับคือ 0, 0.1, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักอาหาร

จำนวนวันหลังได้รับวัคซีน	ค่า SO anion (unit)			
	ชุดควบคุม	ชุดที่กินอาหารผสมวัคซีน 0.1 %	ชุดที่กินอาหารผสมวัคซีน 0.5 %	ชุดที่กินอาหารผสมวัคซีน 1 %
10	12.20 ± 2.2^{a}	26.75 ± 12.75^{a}	40.60 ± 14.77^{b}	53.00 ± 22.11^{b}
20	13.60 ± 4.80^{a}	27.00 ± 9.04^{b}	39.70 ± 11.74^{c}	54.65 ± 18.69^{d}
30	23.20 ± 6.97^{a}	38.50 ± 15.65^{ab}	54.95 ± 10.12^{b}	82.70 ± 30.70^{c}

ตัวเลขในแนวนอนที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$)

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบค่าความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือดบนอาหาร PCA ของกุ้งที่กินอาหารผสมวัคซีน 4 ระดับคือ 0, 0.1, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักอาหาร

จำนวนวันหลังได้รับวัคซีน	ปริมาณแบคทีเรียที่เหลือในน้ำเลือด ($\times 10^{2}$ cfu/ml)			
	ชุดควบคุม	ชุดที่กินอาหารผสมวัคซีน 0.1 %	ชุดที่กินอาหารผสมวัคซีน 0.5 %	ชุดที่กินอาหารผสมวัคซีน 1 %
10	3.95 ± 2.44	2.05 ± 0.77	2.70 ± 1.47	2.90 ± 1.52^{ns}
20	5.40 ± 2.10^{a}	2.60 ± 1.04^{b}	2.17 ± 0.67^{b}	1.93 ± 0.76^{b}
30	5.40 ± 1.94^{a}	3.03 ± 1.17^{b}	4.075 ± 1.31^{b}	3.42 ± 1.27^{b}

ตัวเลขในแนวนอนที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$), ns = non significant แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$)
ปริมาณเชื้อเริ่มต้นก่อนฉีดเข้าตัวกุ้งดูรายละเอียดที่ภาคผนวก ค

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบค่าความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียบนอาหาร TCBS ของกุ้งที่กินอาหารผสมวัคซีน 4 ระดับคือ 0, 0.1, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักอาหาร

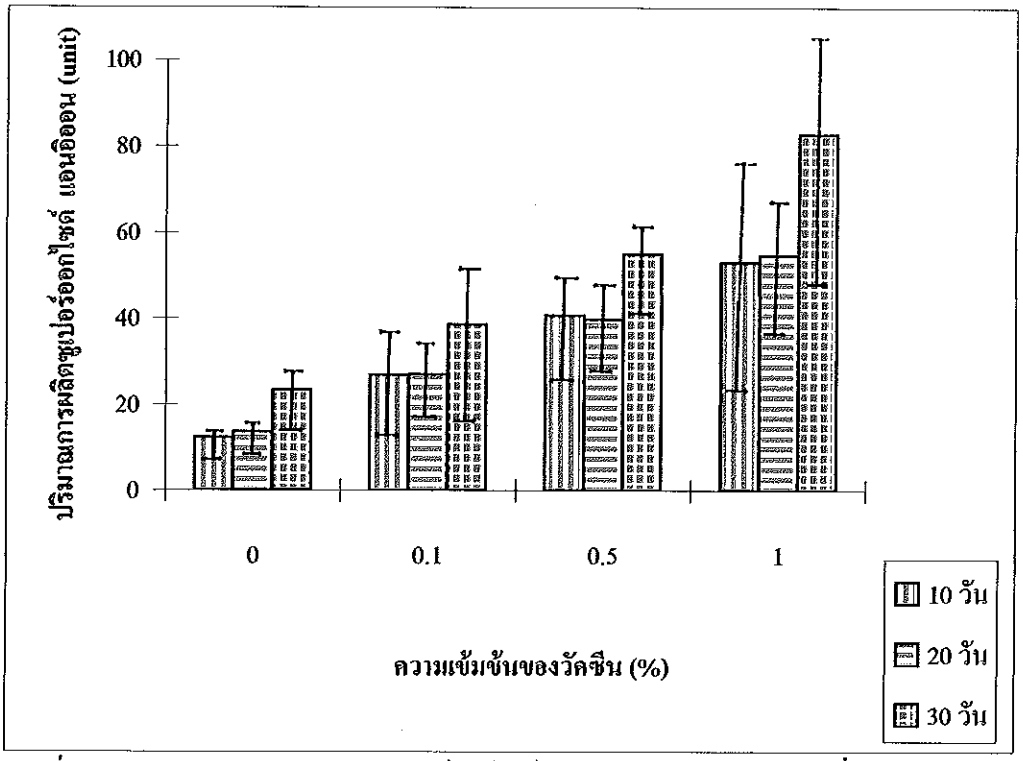
จำนวนวันหลังได้รับวัคซีน	ปริมาณแบคทีเรียที่เหลือในน้ำเลือด ($x10^2$ cfu/ml)			
	ชุดควบคุม	ชุดที่กินอาหารผสมวัคซีน 0.1 %	ชุดที่กินอาหารผสมวัคซีน 0.5 %	ชุดที่กินอาหารผสมวัคซีน 1 %
10	2.07 ± 1.17^a	0.55 ± 0.47^b	0.60 ± 0.46^b	0.90 ± 0.61^b
20	2.55 ± 1.62^a	1.05 ± 0.98^b	0.83 ± 0.73^b	0.85 ± 0.68^b
30	3.25 ± 1.10^a	1.78 ± 1.43^b	1.83 ± 0.92^b	1.73 ± 0.72^b

ตัวเลขในแนวนอนที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$)

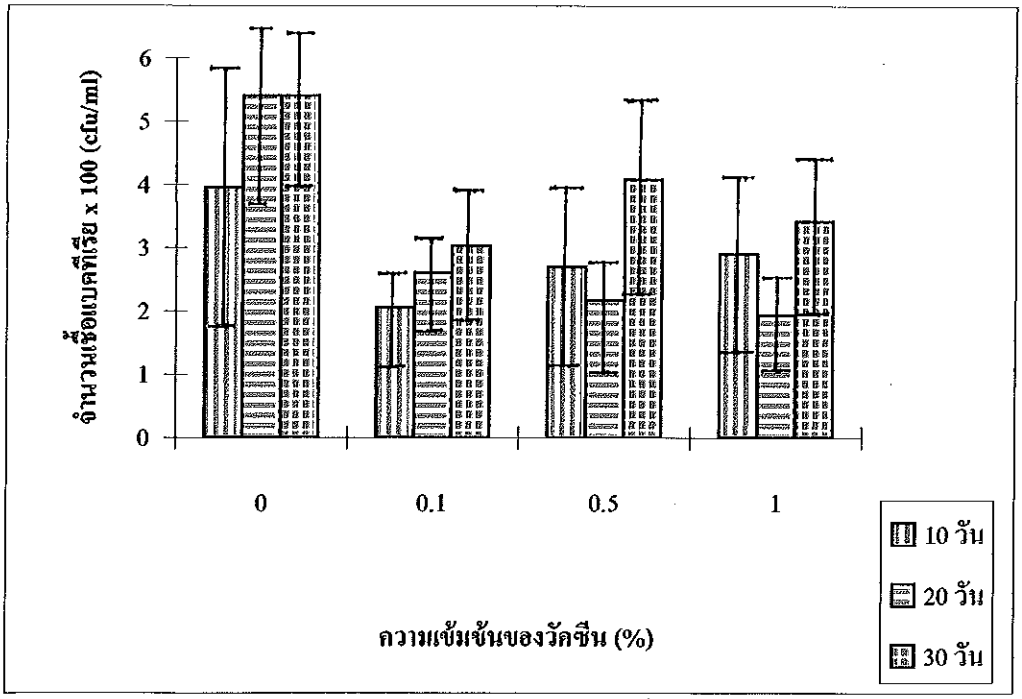
ปริมาณเชื้อเริ่มต้นก่อนฉีดเข้าตัวกุ้งดูรายละเอียดที่ภาคผนวก ค

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของวัคซีน(RPS) ของกุ้งที่กินอาหารผสมวัคซีน 3 ระดับคือ 0.1, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักอาหาร

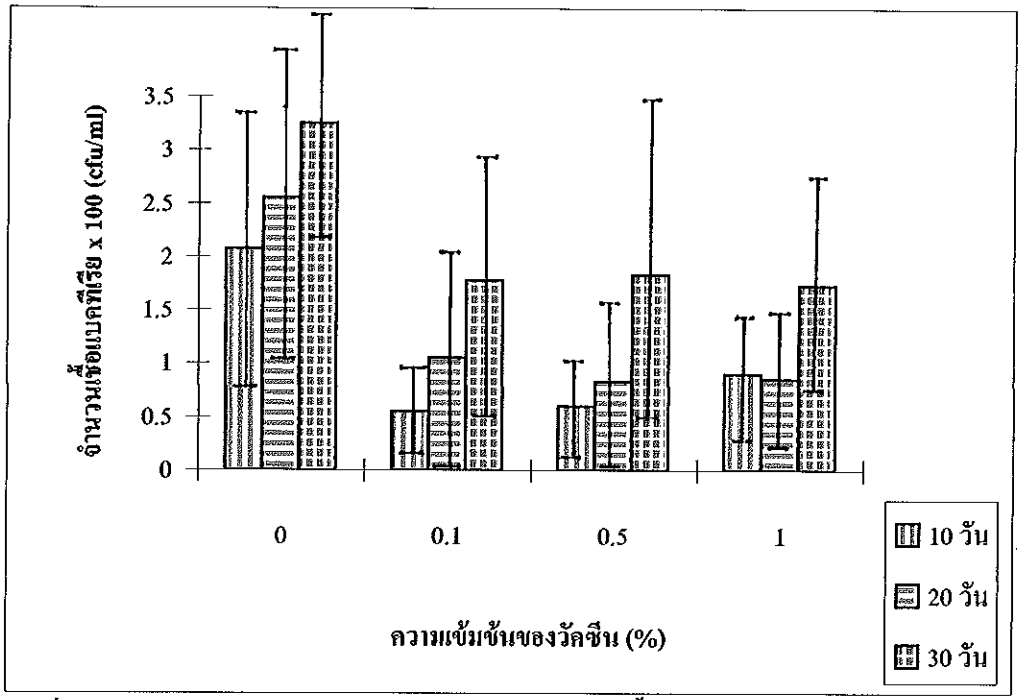
จำนวนวันหลังได้รับวัคซีน	ค่า RPS		
	ชุดที่กินอาหารผสมวัคซีน 0.1 %	ชุดที่กินอาหารผสมวัคซีน 0.5 %	ชุดที่กินอาหารผสมวัคซีน 1 %
10	40	40	40
20	33.33	50	50
30	60	40	60



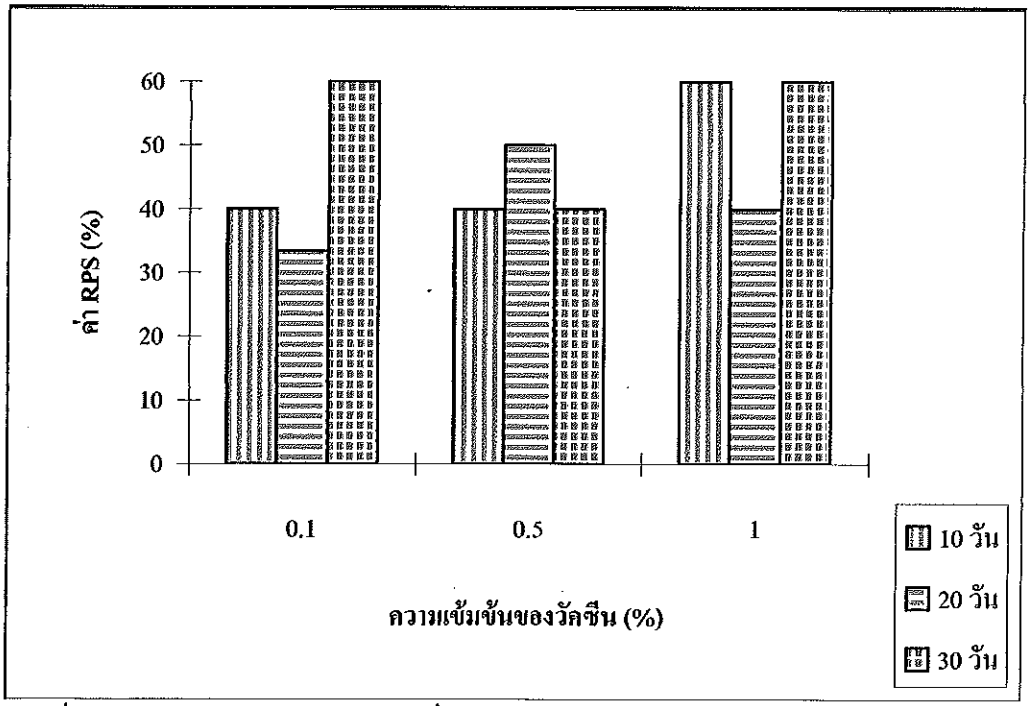
ภาพที่ 11 เปรียบเทียบปริมาณการผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออนในเม็ดเลือดของกุ้งที่กินอาหารผสมวัคซีนเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1% โดยวิเคราะห์วันที่ 10, 20 และ 30 วันหลังจากเริ่มให้วัคซีน



ภาพที่ 12 เปรียบเทียบค่าความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือดบนอาหาร PCA ของกุ้งที่กินอาหารผสมวัคซีนเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1% โดยทำการวิเคราะห์วันที่ 10, 20 และ 30 วันหลังจากเริ่มให้วัคซีน



ภาพที่ 13 เปรียบเทียบค่าความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือดบนอาหาร TCBSของกุ้งที่กินอาหารผสมวัคซีนเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1% โดยทำการวิเคราะห์วันที่ 10, 20 และ 30 วันหลังจากเริ่มให้วัคซีน



ภาพที่ 14 เปรียบเทียบค่า RPS (%) ของชุดที่กินอาหารผสมวัคซีนเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1 % โดยทำการวิเคราะห์ที่ 10, 20 และ 30 วันหลังจากเริ่มให้วัคซีน

2.2 การให้วัคซีนด้วยวิธีการแช่

หลังจากแช่กุ้งทดลองในสารละลายวัคซีนเข้มข้น 2.5 % โดยใช้อัตราส่วนระหว่างวัคซีนต่อน้ำทะเล คือ 1:250 และแช่วัคซีนซ้ำในวันที่ 14 หลังจากให้วัคซีนครั้งแรก จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ในวันที่ 10, 20 และ 30 วัน นับตั้งแต่วันที่เริ่มให้วัคซีน โดยวิเคราะห์ค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส การผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน ของเม็ดเลือด ความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือด และทดสอบความต้านทานเชื้อ

2.2.1 ค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส

จากการทดลองพบว่า ค่าเฉลี่ยแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสของเม็ดเลือดกุ้งทั้ง 2 ชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ 10 และ 30 วัน ส่วนที่ 20 วัน พบว่าค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสของเม็ดเลือดกุ้งของกลุ่มที่ได้รับวัคซีนสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 11 และ ภาพที่ 15)

2.2.2 การผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน ของเม็ดเลือด

ปริมาณการผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน ของเม็ดเลือด ที่ 10 วันพบว่า ชุดควบคุมและชุดที่แช่วัคซีนไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนที่ 20 และ 30 วันพบว่าชุดที่แช่วัคซีนมีปริมาณการผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน ของเม็ดเลือดสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 12 และ ภาพที่ 16)

2.1.3 ค่าความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือด

ผลการทดลองพบว่า ค่าความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือด เมื่อตรวจผลบนอาหาร PCA ของชุดควบคุมและชุดที่แช่วัคซีนไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ 10, 20 และ 30 วัน (ตารางที่ 13 และ ภาพที่ 17) ส่วนบนอาหาร TCBS พบว่าค่าความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือดที่ 10 วันและ 20 วัน ชุดควบคุมและชุดที่แช่วัคซีนไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนที่ 30 วันค่าความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือดของชุดที่แช่วัคซีนสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 14 และ ภาพที่ 18)

2.2.4 ความต้านทานต่อเชื้อ *V. harveyi*

หลังจากฉีดเชื้อ *V. harveyi* ให้แก่กุ้งทดลองทั้งชุดควบคุมและชุดที่แช่วัคซีนเพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของวัคซีน (RPS) พบว่าการให้วัคซีนด้วยวิธีการแช่โดยใช้วัคซีนเข้ม

ข้น 2.5% มีผลทำให้อัตราการรอดตายเพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ 10, 20 และ 30 วัน เท่ากับ 57.14, 50 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ 4 ชุด พบว่าที่ 10, 20 และ 30 วัน (ตารางที่ 15 และ ภาพที่ 19)

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (PO activity) ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีแช่โดยใช้วัคซีนเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์

จำนวนวันหลังได้รับวัคซีน	ค่า PO activity (unit/min/ mg protein)	
	ชุดควบคุม	กลุ่มที่แช่วัคซีนเข้มข้น 2.5%
10	434.88 ± 245.17	448.90 ± 191.51^{ns}
20	229.45 ± 100.08^{a}	359.26 ± 45.33^{b}
30	557.60 ± 172.75	673.21 ± 213.28^{ns}

ตัวเลขในแนวนอนที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$), ns = non significant แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$)

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบปริมาณการผลิต ซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน (SO anion) ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีแช่โดยใช้วัคซีนเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์

จำนวนวันหลังได้รับวัคซีน	ค่า SO anion (unit)	
	ชุดควบคุม	กลุ่มที่แช่วัคซีนเข้มข้น 2.5%
10	38.00 ± 20.00	43.55 ± 17.16^{ns}
20	27.50 ± 14.59^{a}	70.64 ± 36.13^{b}
30	19.92 ± 7.28^{a}	43.22 ± 15.30^{b}

ตัวเลขในแนวนอนที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$), ns = non significant แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$)

ตารางที่ 13 เปรียบเทียบค่าความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือดบนอาหาร PCA ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีแช่โดยใช้วัคซีนเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์

จำนวนวันหลังได้รับวัคซีน	ปริมาณแบคทีเรียที่เหลือ ในน้ำเลือด ($\times 10^3$ cfu/ml)	
	ชุดควบคุม	กลุ่มที่แช่วัคซีนเข้มข้น 2.5%
10	3.16 ± 7.23	2.93 ± 4.69^{ns}
20	5.56 ± 4.15	2.65 ± 2.73^{ns}
30	0.48 ± 0.38	0.24 ± 0.18^{ns}

ns = non significant แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$)
ปริมาณเชื้อเริ่มต้นก่อนฉีดเข้าตัวกุ้งดูรายละเอียดที่ภาคผนวก ค

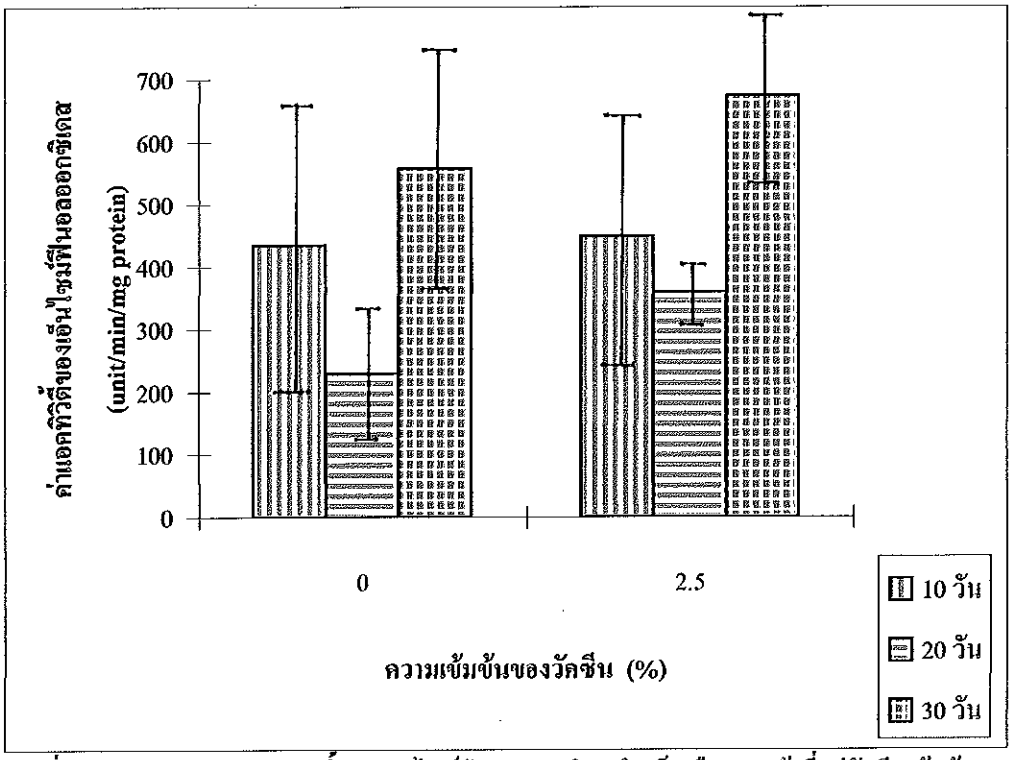
ตารางที่ 14 เปรียบเทียบค่าความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือดบนอาหาร TCBS ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีแช่โดยใช้วัคซีนเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์

จำนวนวันหลังได้รับวัคซีน	ปริมาณแบคทีเรียที่เหลือ ในน้ำเลือด ($\times 10^3$ cfu/ml)	
	ชุดควบคุม	กลุ่มที่แช่วัคซีนเข้มข้น 2.5%
10	1.13 ± 1.31	0.77 ± 0.48^{ns}
20	0.82 ± 1.16	0.45 ± 0.47^{ns}
30	0.25 ± 0.11^{a}	0.04 ± 0.02^{b}

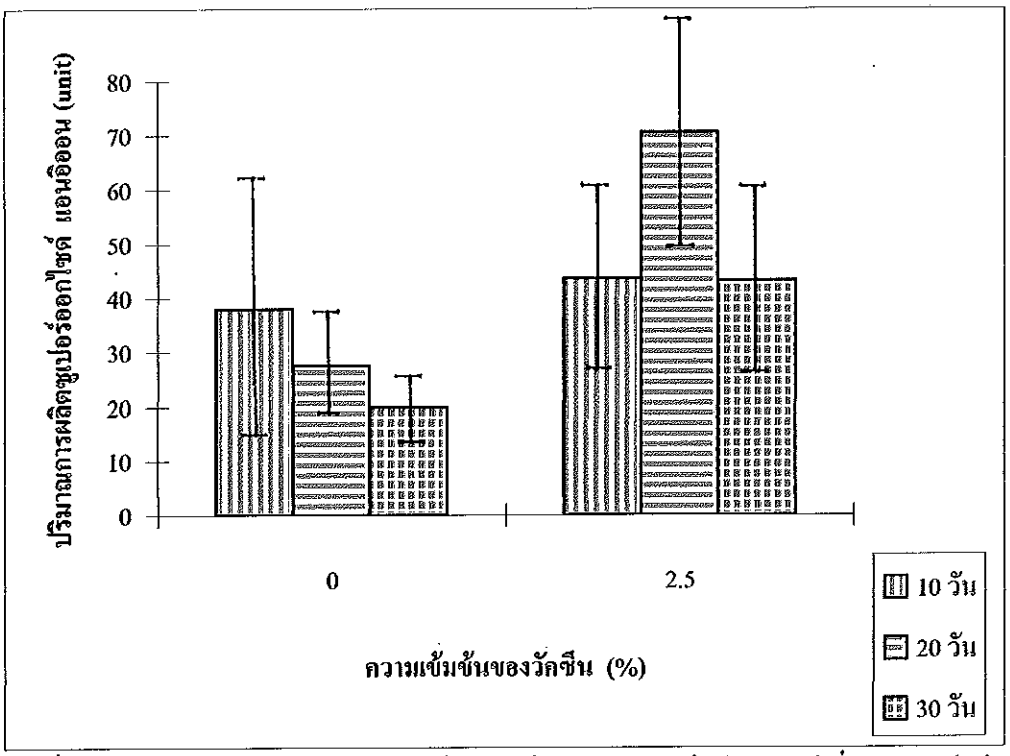
ตัวเลขในแนวนอนที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$), ns = non significant แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$)
ปริมาณเชื้อเริ่มต้นก่อนฉีดเข้าตัวกุ้งดูรายละเอียดที่ภาคผนวก ค

ตารางที่ 15 ประสิทธิภาพของวัคซีน (RPS) ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีแช่โดยขั้น 2.5 เปอร์เซ็นต์

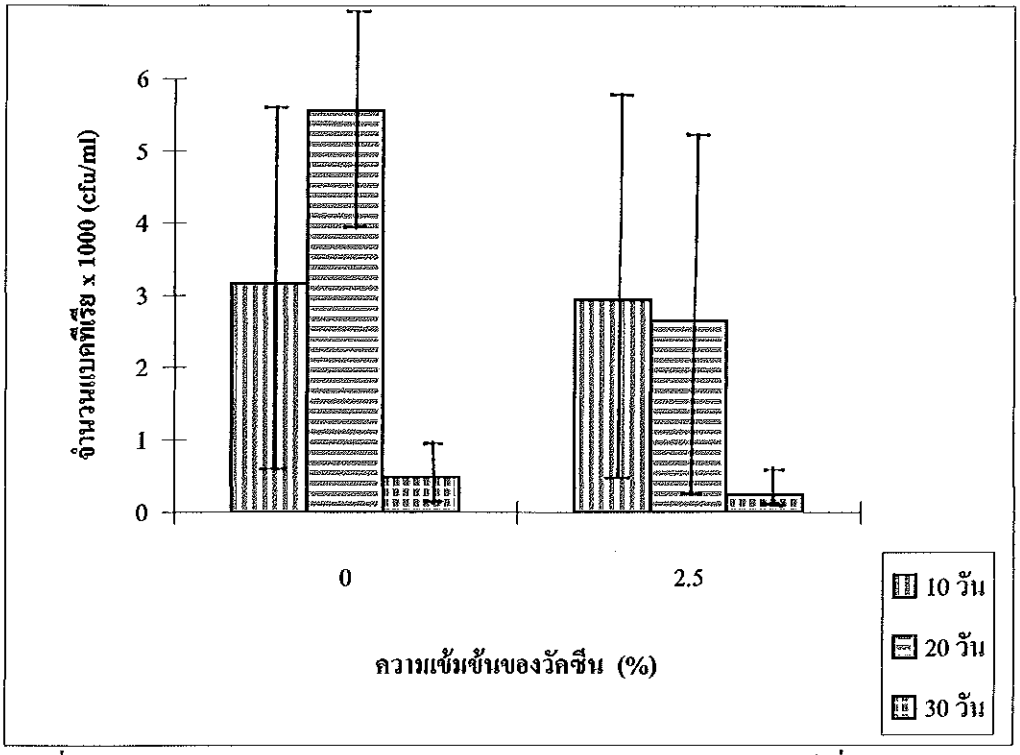
จำนวนวันหลังได้รับวัคซีน	ค่า RPS กลุ่มที่แช่วัคซีนเข้มข้น 2.5%
10	57.14
20	50
30	50



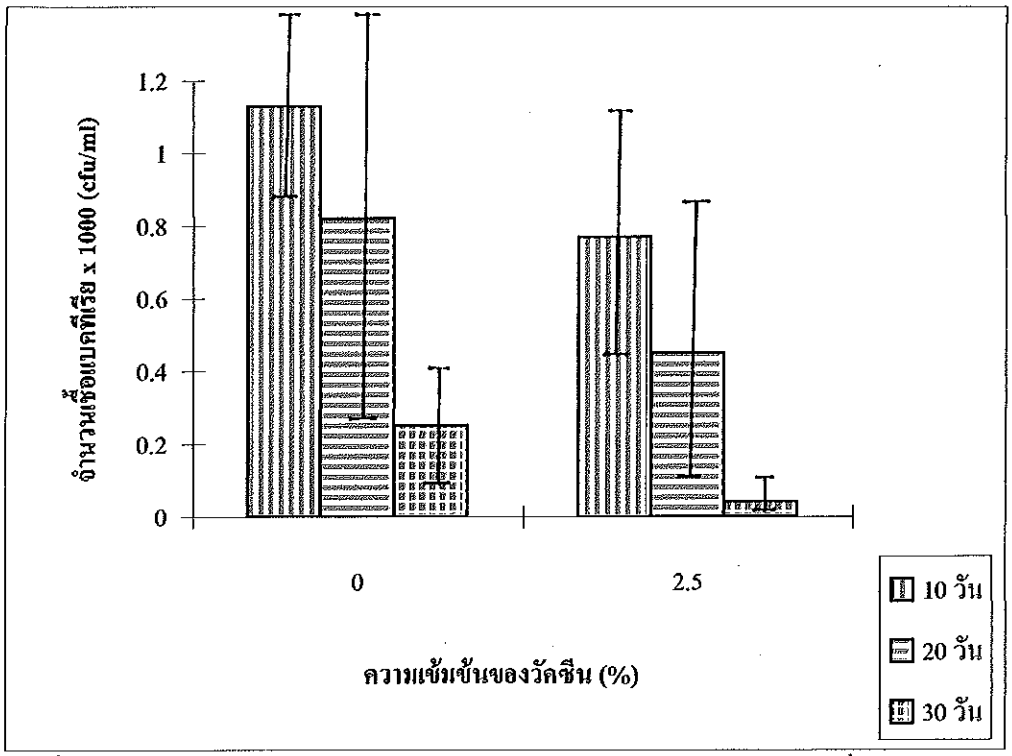
ภาพที่ 15 เปรียบเทียบค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในเม็ดเลือดของกุ้งที่แช่วัคซีนเข้มข้น 2.5% และชุดควบคุม โดยทำการวิเคราะห์ที่ 10, 20 และ 30 วันหลังจากเริ่มแช่วัคซีน



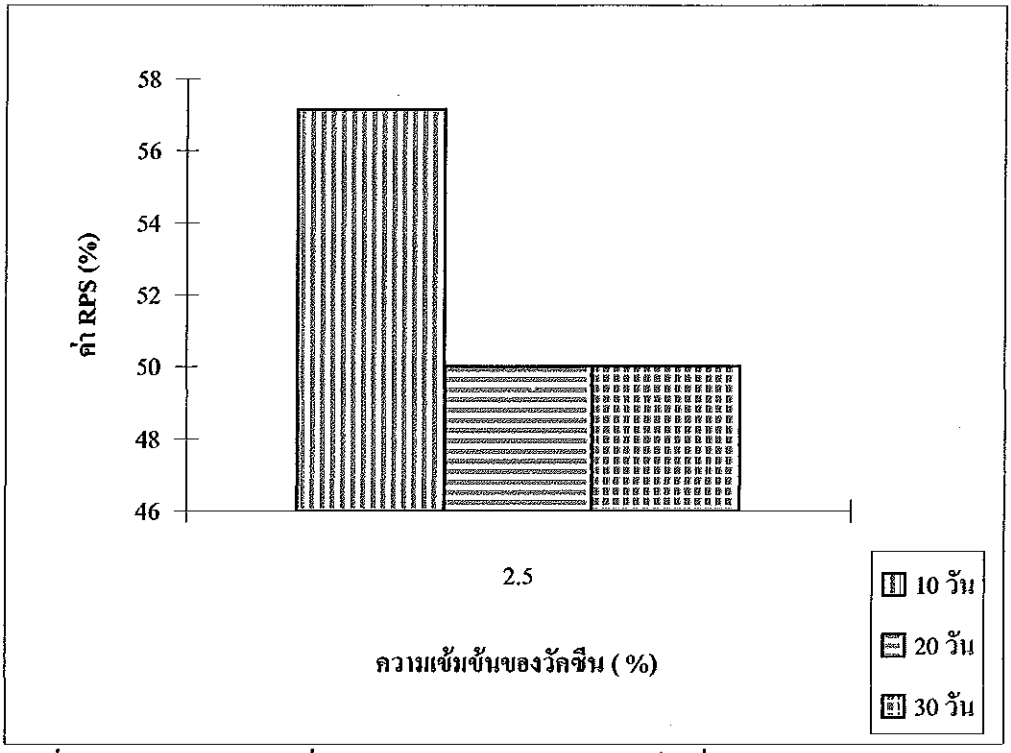
ภาพที่ 16 เปรียบเทียบปริมาณการผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออนในเม็ดเลือดของกุ้งที่แช่วัคซีนเข้มข้น 2.5 % และชุดควบคุม โดยทำการวิเคราะห์ที่ 10, 20 และ 30 วันหลังจากเริ่มแช่วัคซีน



ภาพที่ 17 เปรียบเทียบค่าความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งที่แช่วัคซีน เข้มข้น 2.5% และกลุ่มควบคุม โดยวิเคราะห์วันที่ 10, 20 และ 30 วันหลังจากแช่วัคซีน



ภาพที่ 18 เปรียบเทียบค่าความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียบนอาหาร TCBS ของกุ้งที่แช่วัคซีน เข้มข้น 2.5% และกลุ่มควบคุม โดยวิเคราะห์วันที่ 10, 20 และ 30 วันหลังจากแช่วัคซีน



ภาพที่ 19 ค่า RPS (%) ของชุดที่แช่วัคซีนเข้มข้น 2.5%โดยวิเคราะห์วันที่ 10, 20 และ 30 วัน หลังจากให้วัคซีน

2.3 การให้วัคซีนด้วยวิธีฉีด

หลังจากฉีดวัคซีนให้แก่กุ้งทดลองโดยใช้วัคซีน 0.1 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกลุ่มควบคุมฉีดน้ำเกลือปลอดเชื้อเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ในวันที่ 10, 20 และ 30 นับตั้งแต่วันที่เริ่มฉีด โดยวิเคราะห์ค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส การผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน ของเม็ดเลือด ความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือด และทดสอบความต้านทานเชื้อ

2.3.1 ค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส

จากการทดลองพบว่า ค่าเฉลี่ยแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสของเม็ดเลือดกุ้งที่ 10 และ 20 วัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างชุดควบคุมกับชุดที่ฉีดวัคซีนเข้มข้น 0.1 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ 30 วัน พบว่าค่าเฉลี่ยแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสของเม็ดเลือดของชุดที่ฉีดวัคซีนเข้มข้น 0.1 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ มีค่าสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 16 และภาพที่ 20)

2.3.2 การผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน ของเม็ดเลือด

ปริมาณการผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน ของเม็ดเลือด ที่ 10, 20 และ 30 วัน พบว่า ชุดที่ฉีดวัคซีนเข้มข้น 0.1 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ มีค่าสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญยิ่งแต่ระหว่างชุดที่ฉีดวัคซีน 0.1 เปอร์เซ็นต์ และ ชุดที่ฉีดวัคซีนเข้มข้น 0.25เปอร์เซ็นต์ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 17 และ ภาพที่ 21)

2.3.3 ค่าความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือด

ผลการทดลองพบว่าค่าความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือดบนอาหาร PCA และ TCBS ของชุดที่ฉีดวัคซีนเข้มข้น 0.1 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์สูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ 10, 20 และ 30 วัน แต่ค่าความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือดระหว่างชุดระหว่างชุดที่ฉีดวัคซีน 0.1 เปอร์เซ็นต์และชุดที่ฉีดวัคซีนเข้มข้น 0.25 เปอร์ เซ็นต์ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 18, ภาพที่ 22 และ ตารางที่ 19, ภาพที่ 23)

2.3.4 ความต้านทานต่อเชื้อ *V. harveyi*

หลังจากฉีดเชื้อ *V. harveyi* ให้แก่กุ้งทดลองทั้ง 3 ชุด พบว่าที่ 10, 20 และ 30 วัน ค่า RPS ของชุดที่ฉีดวัคซีนเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์แสดงให้เห็นว่าวัคซีนมีผลให้อัตราการรอดตายเพิ่มมากขึ้น 70, 87.5 และ 67 เปอร์เซ็นต์ ชุดที่ฉีดวัคซีนเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ มีผล

ให้อัตราการรอดตายเพิ่มมากขึ้น 70, 87.5 และ 83.33 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 20 และ ภาพที่ 24)

ตารางที่ 16 เปรียบเทียบค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (PO activity) ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีฉีดโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.1 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกลุ่มกลุ่มควบคุมฉีดน้ำเกลือปลอดเชื้อเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์

จำนวนวันหลังได้รับวัคซีน	ค่า PO activity (unit /min/mg protein)		
	ชุดควบคุม	กลุ่มที่ได้รับวัคซีนเข้มข้น 0.1%	กลุ่มที่ได้รับวัคซีนเข้มข้น 0.25%
10	174.57 ± 60.64	199.19 ± 117.16	178.22 ± 78.66^{ns}
20	228.20 ± 69.23	233.11 ± 56.36	285.87 ± 99.00^{ns}
30	153.62 ± 91.39^{a}	290.78 ± 78.60^{b}	305.14 ± 128.50^{b}

ตัวเลขในแนวนอนที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$), ns = non significant แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$)

ตารางที่ 17 เปรียบเทียบปริมาณการผลิต ซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน (SO anion)ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีฉีดโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.1 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกลุ่มควบคุมฉีดน้ำเกลือปลอดเชื้อเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์

จำนวนวันหลังได้รับวัคซีน	ค่า SO anion (unit)		
	ชุดควบคุม	กลุ่มที่ได้รับวัคซีนเข้มข้น 0.1%	กลุ่มที่ได้รับวัคซีนเข้มข้น 0.25%
10	25.95 ± 26.03^{a}	78.85 ± 11.73^{b}	79.30 ± 20.98^{b}
20	19.45 ± 12.29^{a}	79.25 ± 10.51^{b}	80.25 ± 20.96^{b}
30	23.55 ± 12.59^{a}	58.65 ± 10.88^{b}	69.70 ± 16.67^{b}

ตัวเลขในแนวนอนที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$)

ตารางที่ 18 เปรียบเทียบค่าความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีฉีดโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.1 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกลุ่มควบคุมฉีดน้ำเกลือปลอดเชื้อเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์

จำนวนวันหลังได้รับวัคซีน	จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เหลือในน้ำเลือด (x 10^2 cfu/ml)		
	ชุดควบคุม	กลุ่มที่ได้รับวัคซีนเข้มข้น 0.1%	กลุ่มที่ได้รับวัคซีนเข้มข้น 0.25%
10	4.025 ± 1.20^a	1.02 ± 0.38^b	2.30 ± 0.78^b
20	4.200 ± 1.76^a	2.30 ± 1.32^b	2.35 ± 1.11^b
30	4.400 ± 0.96^a	2.45 ± 0.49^b	2.55 ± 0.55^b

ตัวเลขในแนวนอนที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$)

ปริมาณเชื้อเริ่มต้นก่อนฉีดเข้าตัวกุ้งดูรายละเอียดที่ภาคผนวก ค

ตารางที่ 19 เปรียบเทียบค่าความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียบนอาหาร TCBS ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีฉีดโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.1 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกลุ่มควบคุมฉีดน้ำเกลือปลอดเชื้อเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์

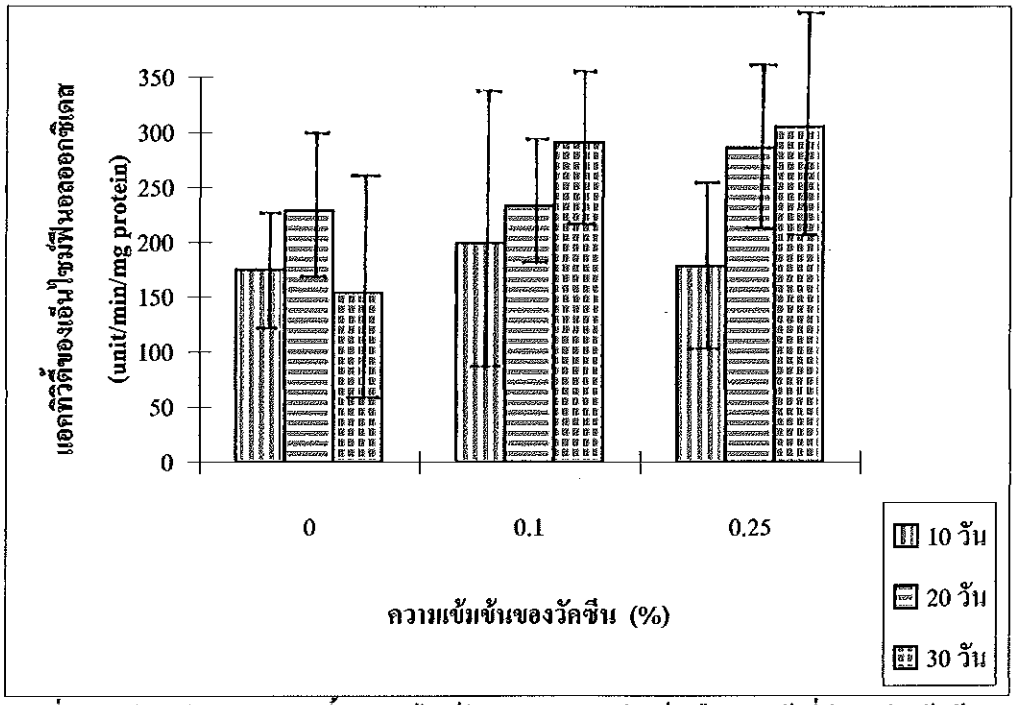
จำนวนวันหลังได้รับวัคซีน	จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เหลือในน้ำเลือด (x 10^2 cfu/ml)		
	ชุดควบคุม	กลุ่มที่ได้รับวัคซีนเข้มข้น 0.1%	กลุ่มที่ได้รับวัคซีนเข้มข้น 0.25%
10	2.675 ± 0.86^a	0.400 ± 0.29^b	0.850 ± 0.29^b
20	2.475 ± 1.95^a	0.425 ± 0.33^b	1.075 ± 0.69^b
30	$3.0+25 \pm 1.16^a$	1.400 ± 0.46^b	1.525 ± 0.40^b

ตัวเลขในแนวนอนที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$)

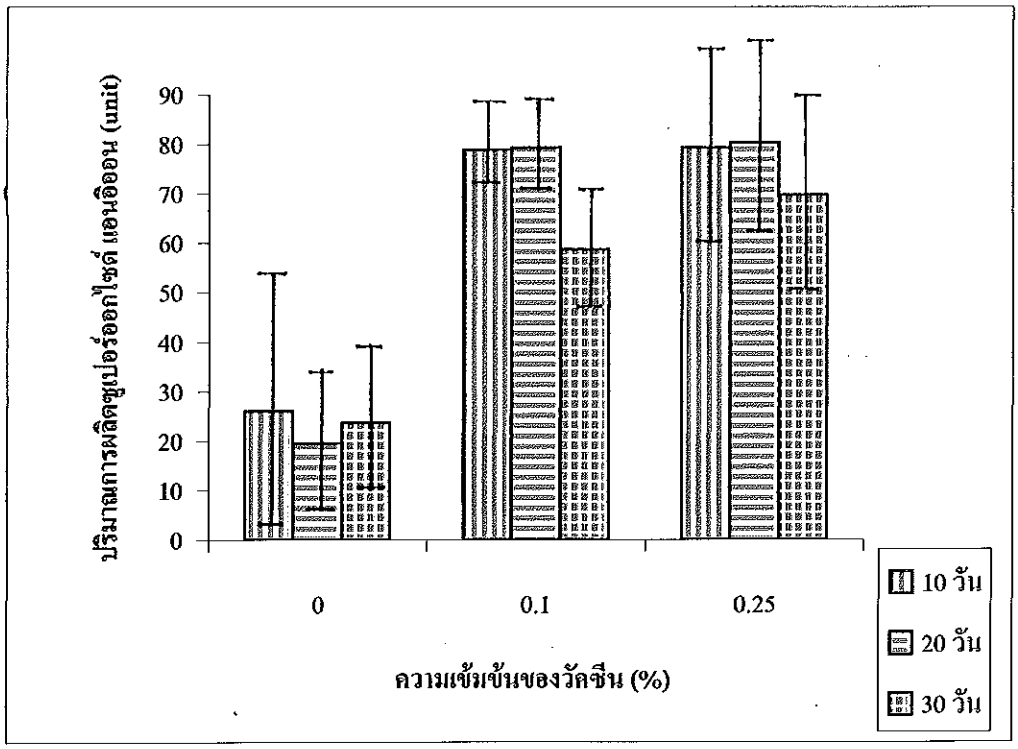
ปริมาณเชื้อเริ่มต้นก่อนฉีดเข้าตัวกุ้งดูรายละเอียดที่ภาคผนวก ค

ตารางที่ 20 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของวัคซีน(RPS) ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีฉีดโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.1 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์

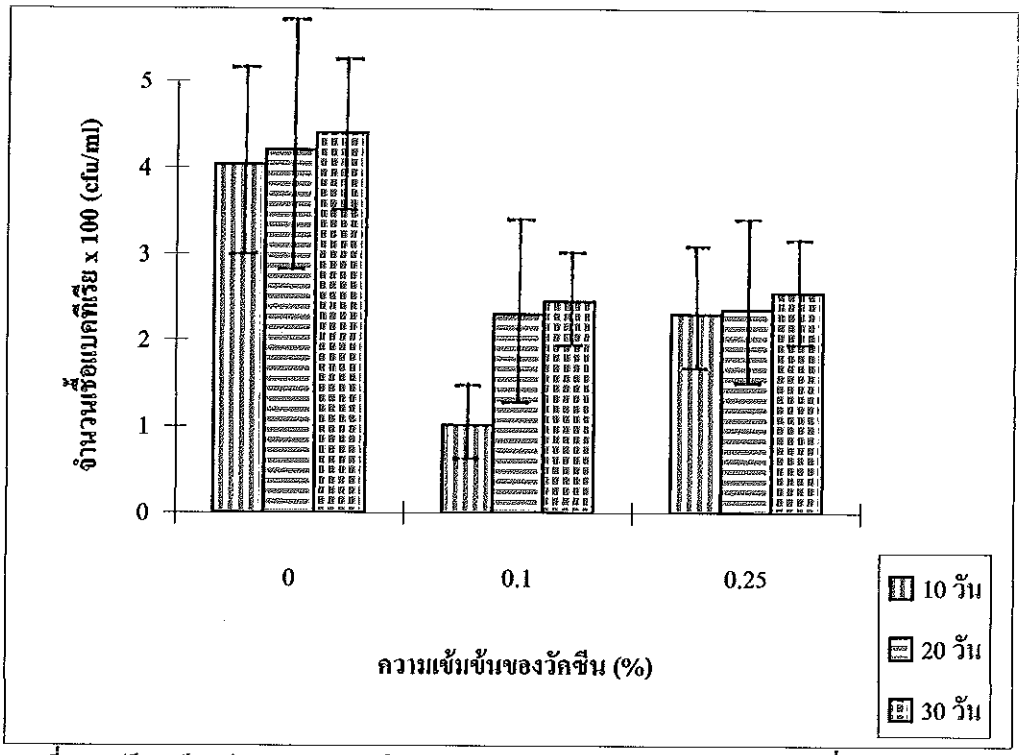
จำนวนวันหลังได้รับวัคซีน	ชุดที่ฉีดวัคซีนเข้มข้น 0.1%	ชุดที่ฉีดวัคซีนเข้มข้น 0.25%
10	70	70
20	87.50	87.50
30	67	83.33



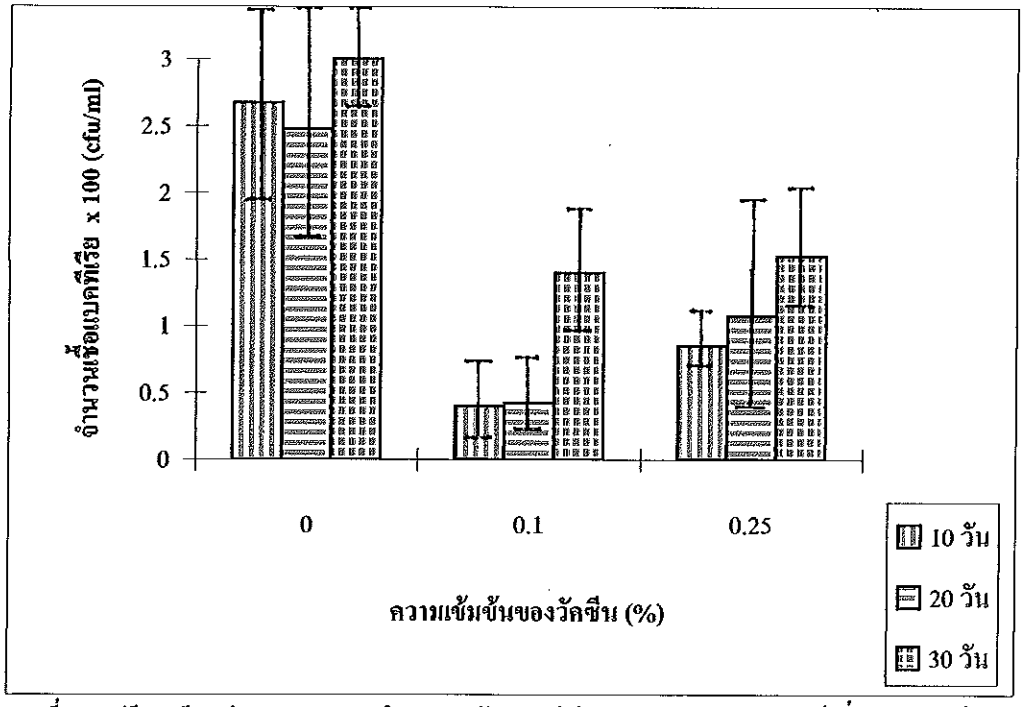
ภาพที่ 20 เปรียบเทียบค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในเม็ดเลือดของกุ้งที่ฉีดวัคซีนเข้มข้น 0.1 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกลุ่มควบคุมฉีดน้ำเกลือเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยวิเคราะห์วันที่ 10 , 20 และ 30 วัน หลังจากเริ่มได้รับวัคซีน



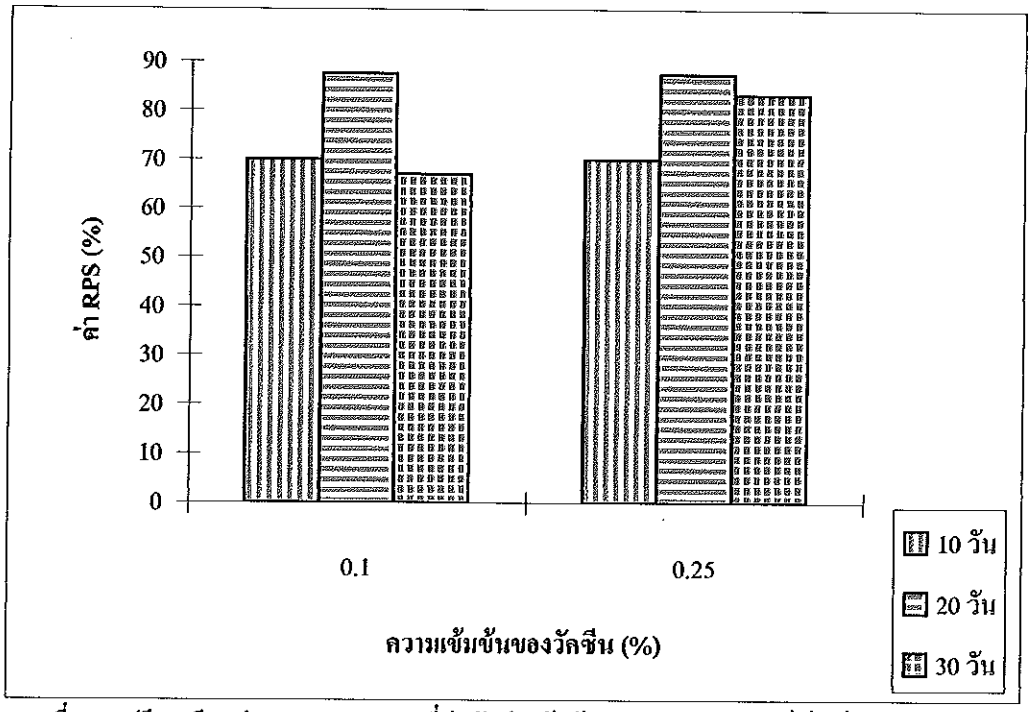
รูปที่ 21 เปรียบเทียบปริมาณการผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออนในเม็ดเลือดของกุ้งที่ฉีดวัคซีนเข้มข้น 0.1 และ0.25 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกลุ่มควบคุมฉีดน้ำเกลือเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยวิเคราะห์วันที่ 10 , 20และ 30 วัน หลังจากเริ่มได้รับวัคซีน



ภาพที่ 22 เปรียบเทียบค่าความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งที่ฉีดวัคซีนเข้มข้น 0.1 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกลุ่มควบคุมฉีดน้ำเกลือเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยวิเคราะห์วันที่ 10, 20 และ 30 วัน หลังจากเริ่มได้รับวัคซีน



ภาพที่ 23 เปรียบเทียบค่าความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียบนอาหาร TCBS ของกุ้งที่ฉีดวัคซีนเข้มข้น 0.1 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกลุ่มควบคุมฉีดน้ำเกลือเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยวิเคราะห์วันที่ 10, 20 และ 30 วัน หลังจากเริ่มได้รับวัคซีน



ภาพที่ 24 เปรียบเทียบค่า RPS (%)ของชุดที่ฉีดวัคซีนเข้มข้น 0.1 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ โดยทำการทดสอบที่ 10, 20 และ 30 วันหลังจากเริ่มให้วัคซีน

บทที่ 4

วิจารณ์

1. การผลิตวัคซีน

ลักษณะของเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทำวัคซีน

จากการวิเคราะห์เชื้อที่แยกได้จากกุ้งกุลาดำที่ป่วยเป็นโรคเรืองแสงเพื่อนำไปผลิตเป็นวัคซีน พบว่าเชื้อที่นำมาใช้คือเชื้อ *Vibrio harveyi* ซึ่งมีลักษณะด้านสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และ คุณสมบัติทางชีวเคมี คือ เซลล์มีรูปร่างท่อน ติดสีแกรมลบ มีแฟลเจลลาที่ขั้วสำหรับใช้ในการเคลื่อนที่ ต้องการโซเดียมคลอไรด์ในการเจริญ เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แต่ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ มณเฑียร ส่งเสริม และคณะ (2533) และ ดารุณี แซ่อุ่ย และคณะ (2530) มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ อะไมเลส เจลลาติเนส สามารถย่อยไลซีนและออร์นิทีน แต่ไม่สามารถย่อยอาร์จินิน สร้างกรดจากการเฟอร์เมนต์ น้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส กาแลคโตส ซูโครส มอลโตส แลคโตส และ เซลโลไบโอส (Le Groumelec *et al.*,1995 ; Jiravanichpaisal *et al.*,1995)

การทดสอบความรุนแรงของเชื้อ โดยการหาค่า LD_{50} พบว่ามีค่าเท่ากับ 7.33 x 10^7 cfu/ml ซึ่งจากการศึกษาของดารุณี แซ่อุ่ย และคณะ (2530) พบว่าระดับความเข้มข้นของเชื้อ *V. harveyi* ที่ทดสอบการทำให้เกิดโรค (pathogenicity) ในลูกกุ้งแชบ๊วยสามารถแสดงการทำให้เกิดโรคได้ที่ความเข้มข้น 10^7 cfu/ml เช่นเดียวกับรายงานของ Inmann (1927) (อ้างโดย ดารุณี แซ่อุ่ย และคณะ, 2530)

ส่วนการทดสอบความไวต่อยาบางชนิดพบว่า เชื้อ *V. harveyi* ที่แยกได้จากกุ้งกุลาดำจะมีความไวต่อยา คลอแรมเฟนนิคัล ไตรเมธโธพริม-ซัลฟาเมธอกซาโซล กานามัยซิน เจนตามัยซิน (Baticados *et al.*, 1990 ; Le Groumellec *et al.*, 1995) เตตร้าซัยคลิน และ นีโอมัยซิน (ดารุณี แซ่อุ่ย และคณะ, 2530)

2. วิธีการให้วัคซีนและปริมาณที่เหมาะสมต่อกุ้งกุลาดำ

2.1 การให้วัคซีนโดยวิธีกิน

ผลการทดลองของวิธีการให้วัคซีนโดยวิธีกิน โดยผสมวัคซีนลงในอาหาร 4 ระดับความเข้มข้นคือ 0, 0.1, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าปริมาณการผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน ของเม็ดเลือดของชุดที่ได้รับวัคซีนที่ 10, 20 และ 30 วันหลังจากเริ่มให้วัคซีนมีค่าสูงกว่าในชุดควบคุม อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง เนื่องจากวัคซีนซึ่งในที่นี้คือเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้ผนังเซลล์แตก และในผนังเซลล์มีส่วนประกอบของไลโปพอลิแซ็กคาร์ไรด์ และ เพปทิโดกลัยแคน (สุวณี สุภเวชย์, 2536) จึงไปมีผลต่อการกระตุ้นให้เม็ดเลือดมีอัตราการเกิดฟาโกซัยโทซิสที่สูงมากขึ้น (Soderhall and cerenius, 1992) และจากการทดลองของ Anderson และคณะ (1992) ทำการตรวจสอบการผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน ของเซลล์เม็ดเลือดของ *Crassostrea virginica* โดยสังเกตุการเกิด NBT reduction โดยพบว่าการเกิดฟาโกซัยโทซิสที่เพิ่มมากขึ้นมีผลโดยตรงต่อการเกิด NBT reduction โดยจะสามารถสังเกตเห็นได้ว่าอนุภาคของ formasan มีการสะสมเพิ่มมากขึ้นในไซโทพลาซึมและโดยเฉพาะที่บริเวณรอบๆ แวคคิวโอลของเซลล์ที่เกิดฟาโกซัยโทซิส ซึ่ง ปริมาณการเกิด NBT reduction นี้เป็นตัววัดปริมาณการผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออนที่เกิดขึ้นในกระบวนการเพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย โดยชนิดของเม็ดเลือดที่ทำหน้าที่ในการเกิดฟาโกซัยโทซิสและผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน ออกมาส่วนใหญ่คือ ไฮยาลินเซลล์ โดยอาจจะมี ลาร์จแกรนูลาร์ฮีโมไซท์ทำหน้าที่ร่วมในการผลิตออพโซนินออกมาช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการเกิดฟาโกซัยโทซิสให้เพิ่มมากขึ้น (Bell and Smith, 1993) โดยผลการทดลองนี้สอดคล้องกับ Boonyaratpalin และคณะ (1995) ที่ศึกษาผลของเพปทิโดกลัยแคนต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ โดยผสมเพปทิโดกลัยแคนลงในอาหารกุ้งกุลาดำ ซึ่งเพปทิโดกลัยแคนนี้ก็เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย โดยพบว่าค่าฟาโกซัยติคแอคทิวิตี้ของกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมเพปทิโดกลัยแคนที่ระดับ 0.005, 0.01 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่ากลุ่มควบคุมทุกชุดการทดลอง ซึ่งก็หมายความว่าค่าการผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออนของกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมเพปทิโดกลัยแคนมีค่าสูงกว่าชุดควบคุมเช่นกัน ส่วนการศึกษาในเรื่องของระยะเวลาหลังจากให้วัคซีนพบว่า ที่ 10 วัน ชุดที่ได้รับอาหารผสมวัคซีน 0.1 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณการผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน ที่สูงกว่าชุดควบคุม แต่ยังไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ซึ่งอาจเกิดเนื่องจากความเข้มข้นของวัคซีนที่ผสมในอาหารอยู่ในระดับต่ำ จึงยังไม่สามารถกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งทำงานได้อย่างเต็มที่

แต่เมื่อกุ้งได้รับวัคซีนต่อเนื่องกันไปจนถึงวันที่ 20 และ 30 วัน พบว่าปริมาณการผลิต ซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน เพิ่มสูงขึ้น ส่วนในชุดที่กินอาหารผสมวัคซีน 0.5 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ นั้น ที่ 10 วัน ปริมาณการผลิต ซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน สูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยทั้ง 2 ชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมวัคซีน 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ยังไม่มีความแตกต่างกัน แต่เมื่อถึงวันที่ 20 และ 30 วัน พบว่าชุดที่กินอาหารผสมวัคซีน 1 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณการผลิต ซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน สูงมากกว่าชุดที่กินอาหารผสมวัคซีน 0.5 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ซึ่งจะเห็นได้ว่าชุดที่กินอาหารผสมวัคซีน 1 เปอร์เซ็นต์ มีค่าการผลิต ซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน สูงที่สุด

ในการวิเคราะห์ค่าความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือดพบว่าบนอาหาร PCA ที่ 10 วัน ค่าความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือดยังไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างทั้ง 4 ชุดการทดลอง แต่ที่ 20 และ 30 วันหลังจากเริ่มให้วัคซีน พบว่าค่าความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือดของชุดที่ได้รับอาหารผสมวัคซีนมีค่าสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ส่วนการตรวจสอบผลบนอาหาร TCBS ที่ 10, 20 และ 30 วัน พบว่าค่าความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือดของชุดที่ได้รับอาหารผสมวัคซีนทุกชุดการทดลองมีค่าสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยดูจากปริมาณแบคทีเรียที่อยู่ในน้ำเลือด โดยชุดควบคุมจะมีปริมาณแบคทีเรียอยู่ในน้ำเลือดสูงกว่าชุดที่ได้รับวัคซีน ซึ่งแสดงว่าค่าความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือดของกลุ่มควบคุมต่ำกว่าชุดที่ได้รับวัคซีน โดยทั่วไปแล้วพบว่าระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งสามารถกำจัดแบคทีเรียที่เข้ามาในร่างกายให้ออกไปจากระบบหมุนเวียนเลือดได้ (Smith and Ratcliffe, 1980) โดยมีกลไกการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกายคือการเกิดฟาโกซัยโทซิส เอนแคปซูเลชั่น และระบบโปรพีโอ เข้ามามีบทบาทในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่บุกรุกเข้ามาโดยมีเม็ดเลือดชนิดต่างๆทำหน้าที่ร่วมกัน (Soderhall and Cerenius, 1992) โดยอาจมีสารภายในร่างกายทำหน้าที่กระตุ้นให้เม็ดเลือดเกิดการกำจัดแบคทีเรียที่บุกรุกเข้ามาในร่างกายได้มากขึ้น Lewis (1973) ได้รายงานว่าหลังจาก brown shrimp (*P. aztecus*) ได้รับเชื้อแบคทีเรียก็จะเกิดการชักนำสาร humoral factor ขึ้นในร่างกายและสามารถกำจัดแบคทีเรียที่บุกรุกเข้ามาได้ภายใน 48 ชั่วโมงซึ่งสอดคล้องกับ Evans และคณะ (1968) ; Weinheimer และคณะ (1969) ; Stewart and Zwicker (1972) และ Paterson และคณะ (1976) ที่พบว่าหลังจากสัตว์กลุ่ม

ครัสเตเชี่ยนได้รับเชื้อแบคทีเรียจะสามารถตรวจพบสาร bactericidin ขึ้นในร่างกาย Mori และ Stewart (1978) รายงานว่าที่บริเวณตับอ่อนของกุ้ง american lobster พบว่า bactericidal activity เข้ามามีบทบาทอย่างมากในการกำจัดแบคทีเรียที่บุกรุกเข้ามาในร่างกาย ดังนั้นเมื่อกุ้งได้รับวัคซีนซึ่งมีส่วนประกอบของไลโปพอลิแซ็กคาร์ไรด์และเพปทิโดกลัยแคน ซึ่งเป็นสารที่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ (Unestem and Soderhall, 1977) จึงทำให้ภูมิคุ้มกันของกุ้งที่ได้รับวัคซีนทำงานได้ดียิ่งขึ้นจึงสามารถกำจัดแบคทีเรียที่บุกรุกเข้ามาในร่างกายได้ดีกว่ากลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับวัคซีน

จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวัคซีน (RPS) พบว่า ที่ 10, 20 และ 30 วัน หลังจากให้วัคซีน พบว่าประสิทธิภาพของปริมาณวัคซีนที่ผสมในอาหารทั้ง 3 ระดับคือ 0.1, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ มีค่าใกล้เคียงกัน และมีค่าอยู่ระหว่าง 33.33 - 60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งวัคซีนที่ดีต้องมีค่า RPS สูงมากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ (Ellis,1988) ทั้งนี้อาจเกิดได้จากวิธีการให้วัคซีนโดยผสมลงในอาหารนี้ยังมีข้อเสียหลายประการที่อาจทำให้กุ้งไม่สามารถได้รับวัคซีนได้อย่างเต็มที่ เช่น ในเรื่องของการสูญเสียวัคซีนบางส่วนที่ละลายไปในน้ำขณะที่ให้อาหารกุ้ง และอาจเกิดเนื่องจากกระบวนการย่อยอาหารในร่างกายของกุ้งเองว่าจะสามารถดูดซึมวัคซีนไปใช้ได้มากน้อยเพียงใด เพราะเชื้อหรือแอนติเจนที่อยู่ในวัคซีนจะถูกทำลายในระบบย่อยในส่วนท้ายของทางเดินอาหารของร่างกายก่อนที่จะมีการดูดซึมแอนติเจนนั้นเพื่อใช้กระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Ellis,1988) ซึ่งในจุดนี้ต้องมีการศึกษาและพัฒนาเทคนิควิธีการให้วัคซีนโดยวิธีการกินในด้านต่างๆเพิ่มมากขึ้น เพื่อให้การใช้วัคซีนวิธีการนี้เกิดประสิทธิภาพให้มากขึ้น เนื่องจากวิธีให้วัคซีนโดยวิธีการกิน เป็นวิธีที่สะดวกและเหมาะสมในภาคสนามมากที่สุด

ส่วนการเปรียบเทียบค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส พบว่าที่ 10, 20 และ 30 วันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ อาจเป็นเพราะว่าชนิดของเม็ดเลือดที่ทำหน้าที่ในการเกิดระบบโปรพีโอเป็นซนิด เซมิแกรนูลาร์ ฮีโมไซท์ ที่จะต้องทำหน้าที่ในการหลั่งสารต่างๆในระบบโปรพีโอออกมา ซึ่งการทดลองครั้งนี้ได้เลี้ยงกุ้งในตู้กระจกซึ่งมีผลให้อุณหภูมิของน้ำที่ใช้เลี้ยงมีการเปลี่ยนแปลงได้ง่าย ซึ่งอาจส่งผลให้กุ้งเกิดความเครียดและมีผลต่อการสร้างเซลล์เม็ดเลือดชนิดต่างๆให้ไม่เป็นไปตามปกติ โดยอาจมีผลทำให้การผลิตเซลล์เม็ดเลือดชนิด เซมิแกรนูลาร์ ฮีโมไซท์ มีจำนวนน้อย ซึ่งทำให้เมื่อเปรียบเทียบค่าแอคทิวิตี้ของ

เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสระหว่างชุดที่ได้รับวัคซีนกับชุดควบคุมจึงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ นอกจากนี้วงจรของการลอกคราบในกุ้งอาจจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของชนิดเม็ดเลือด โดยในระยะก่อนการลอกคราบ อวัยวะที่สร้างเม็ดเลือดจะมีการสะสมเม็ดเลือดชนิดไฮยาลินเซลล์มากขึ้น จากนั้นจึงส่งเข้าสู่ระบบไหลเวียนเลือด โดยเซลล์เม็ดเลือดที่มีอายุมากที่ไหลเวียนอยู่ในระบบหมุนเวียนเลือดจะถูกจับรวมกันอยู่ที่บริเวณผนังของเนื้อเยื่อและฟาโกซัยท์เซลล์จะเข้ามาในระบบหมุนเวียนเลือดเพื่อกำจัดเซลล์เม็ดเลือดที่ตาย ทำให้จำนวนเม็ดเลือดระหว่างการลอกคราบมีการเปลี่ยนแปลงทั้งในแง่ของจำนวนและชนิดของเม็ดเลือด (Maynard, 1953 อ้างโดย Waterman, 1960)

2.2 วิธีการให้วัคซีนด้วยวิธีแช่

จากผลการทดลองให้วัคซีนแก่กุ้งกุลาดำด้วยวิธีการแช่ โดยใช้วัคซีนเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ และใช้วัคซีนในอัตราส่วนระหว่างวัคซีนต่อน้ำคือ 1 : 250 ทำการแช่วัคซีนในระดับความเข้มข้นเดิมซ้ำอีกครั้งในวันที่ 14 หลังจากแช่วัคซีนครั้งแรก ซึ่งผลการทดลองพบว่า ค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสของกุ้งที่แช่วัคซีนกับกลุ่มควบคุมไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ 10 และ 30 วัน โดยพบว่าค่าเฉลี่ยของแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในกลุ่มที่แช่วัคซีนจะมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมโดยกลุ่มที่แช่วัคซีนที่ 10 และ 30 วัน มีค่าเฉลี่ยของแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส เท่ากับ 448.90 และ 673.21 ส่วนกลุ่มควบคุมมีค่าเท่ากับ 434.88 และ 557.360 unit/min/mg protein ตามลำดับ แต่ที่ 20 วัน พบว่าค่าเฉลี่ยของแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสของกลุ่มที่แช่วัคซีนมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง คือกลุ่มที่แช่วัคซีนมีค่า 359.26 ขณะที่กลุ่มควบคุมมีค่า 229.45 unit/min/mg protein การที่พบความแตกต่างของค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสระหว่างกลุ่มที่แช่วัคซีนและกลุ่มควบคุมที่ 20 วัน อาจเกิดเนื่องจากการแช่วัคซีนซ้ำในวันที่ 14 หลังจากแช่วัคซีนครั้งแรก ทำให้การเก็บตัวอย่างในการวิเคราะห์ที่ 20 วัน ห่างจากการแช่วัคซีนครั้งที่ 2 เพียง 6 วัน จึงอาจมีผลทำให้วัคซีนที่กุ้งได้รับยังสามารถกระตุ้นให้ระบบโปรพีโอ ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพค่อนข้างดีเพราะเพิ่งจะได้รับการกระตุ้นระบบให้มีความว่องไว ในขณะที่การวิเคราะห์ในวันที่ 10 และ 30 วัน ระยะห่างจากการแช่วัคซีนจนถึงวันที่วิเคราะห์จะห่างมากกว่าการวิเคราะห์ในวันที่ 20 จึงอาจทำให้ความสามารถในการกระตุ้นระบบโปรพีโอของวัคซีนเริ่มลดลง จนทำให้ไม่เห็นความแตกต่างทาง

สถิติระหว่างกลุ่มที่ได้รับวัคซีนและกลุ่มควบคุมในการวิเคราะห์ที่ 10 และ 30 วัน และอาจเป็นเพราะการตอบสนองของระบบโปรพีโอนี้ยังขึ้นอยู่กับชนิดของเม็ดเลือดดังที่ได้กล่าวมาแล้วในส่วนของวิธีการให้วัคซีนด้วยวิธีกิน นอกจากนี้ยังมีการทดลองของ Sung และคณะ (1996) ได้ทดลองใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน 3 ชนิด คือเชื้อ *V. vulnificus* ที่ถูกฆ่าด้วยความร้อน β-1-3 glucan และ zymosan โดยให้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันแก่กุ้งกุลาดำด้วยวิธีแช่ จากนั้นทำการตรวจสอบแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ที่ 5 นาที 3, 6, 12, 24 และ 72 ชั่วโมง โดยพบว่าค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสมีค่าเพิ่มมากขึ้นสูงสุดที่ 3 ชั่วโมงหลังจากทำการแช่และมีค่าลดลงจนอยู่ในระดับปกติที่ 72 ชั่วโมงหลังทำการแช่สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันสามารถกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันทำงานได้ดีขึ้นในช่วงเวลาสั้นๆ เท่านั้น จึงทำให้ผลการตอบสนองของแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสให้ผลที่ไม่ชัดเจน

ส่วนผลของปริมาณการผลิต ซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน ของกุ้งพบว่าที่ 10 วัน ปริมาณ ซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน ที่ผลิตได้ของกลุ่มที่ได้แช่วัคซีนและกลุ่มควบคุมยังไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่กลุ่มที่แช่วัคซีนมีค่าปริมาณการผลิต ซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน ที่สูงกว่ากลุ่มควบคุม คือกลุ่มที่แช่วัคซีนมีปริมาณการผลิต ซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน 43.55 unit ส่วนกลุ่มควบคุมมีค่า 38 unit สำหรับการวิเคราะห์ที่ 20 และ 30 วัน พบว่าปริมาณการผลิต ซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน ของกลุ่มที่ได้รับวัคซีนมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ซึ่งการตอบสนองของภูมิคุ้มกันในกุ้งโดยใช้ค่าปริมาณการผลิต ซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน เป็นพารามิเตอร์ในการวัดของการใช้วัคซีนด้วยวิธีการแช่นี้ ผลที่ได้เป็นไปในทางเดียวกันกับชุดที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการกิน คือ ที่ 10 วัน ชุดที่ได้รับอาหารผสมวัคซีนในระดับต่ำจะยังไม่เห็นผลที่แตกต่างของปริมาณการผลิต ซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน กับกลุ่มควบคุม ในขณะที่ 20 และ 30 วัน ปริมาณ ซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน ของกลุ่มที่ได้รับวัคซีนจะสูงกว่าชุดควบคุม โดยได้ให้เหตุผลว่าอาจเกิดเนื่องจากความเข้มข้นของวัคซีนที่กุ้งได้รับยังอยู่ในระดับที่ต่ำ โดยต่อมาเมื่อกุ้งได้รับวัคซีนสะสมเพิ่มมากขึ้น ค่าการผลิต ซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน จึงสูงขึ้นได้ ซึ่งในกรณีของการแช่นี้เนื่องจากมีการแช่วัคซีนซ้ำที่ 14 วันหลังจากแช่ครั้งแรก จึงเหมือนเป็นการกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันให้ทำงานได้ดียิ่งขึ้น ทำให้ในการวิเคราะห์วันที่ 20 และ 30 วันมีค่าการผลิต ซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน ที่สูงมาก

กว่ากลุ่มควบคุม โดยวันที่ 20 จะมีค่าการผลิต ซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน สูงที่สุด เพราะเพิ่งได้รับการแช่วัคซีนซ้ำในวันที่ 14 หลังจากแช่วัคซีนครั้งแรก ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันทำงานได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ปริมาณ ซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน ที่ 10 และ 30 วันหลังจากได้รับวัคซีนครั้งแรก

กิจการ ศุภมาตย์ และ สิทธิ บุณยรัตผลิน (2538) ได้ทำการศึกษาผลของการแช่วัคซีนที่เตรียมจากเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากกุ้งกุลาดำที่เป็นโรค จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อโดยใช้ความร้อน 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยกุ้งในชุดควบคุมจะถูกแช่ในน้ำเกลือเข้มข้น 2.6 เปอร์เซ็นต์ ส่วนชุดที่ได้รับวัคซีนก็จะถูกแช่ในวัคซีนเป็นเวลา 30 นาทีเช่นเดียวกันกับกลุ่มควบคุม จากนั้นนำไปเลี้ยงต่อเป็นเวลา 10 วัน จึงทำการวิเคราะห์ค่าฟาโกซัยติค แอคทิวิตี้ พบว่า ค่าฟาโกซัยติค แอคทิวิตี้ มีค่าเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย

จากที่ได้กล่าวมาในข้างต้นแล้วว่าค่าฟาโกซัยติค แอคทิวิตี้ มีความสัมพันธ์โดยตรงกับค่าการผลิต ซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน ดังนั้นแสดงว่าค่า ซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนโดยการแช่นี้ก็มีค่าเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการวิเคราะห์ค่า ซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน ที่ 10 วันของกุ้งที่ได้รับวัคซีนโดยวิธีการแช่ที่มีค่า ซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเช่นกัน นอกจากนี้ยังมีงานทดลองของ Sung และคณะ (1994) ได้ทำการทดลองแช่ลูกกุ้งกุ้งลาดำลงในสารละลาย β-glucan ที่ระดับ 0.25, 0.5, 1 และ 2 mg/ml เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าลูกกุ้งที่แช่สารละลาย β-glucan ที่ระดับ 0.5, 1 และ 2 mg/ml มีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้น แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงนี้ในลูกกุ้งที่แช่ β-glucan ในระดับ 0.25 mg/ml นำลูกกุ้งทดลองมาทดสอบความต้านทานเชื้อหลังจากวันที่เริ่มแช่ β-glucan 10, 18 และ 43 วัน โดยแช่ลูกกุ้งในสารละลายเชื้อ *V. vulnificus* เข้มข้น 5×10^7 cfu/ml เป็นเวลา 12 ชั่วโมงแล้วบันทึกอัตราการตายพบว่าการแช่ลูกกุ้งลงในสารละลาย β-glucan ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 และ 1 mg/ml มีประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดโรคได้ 18 วันหลังจากทดสอบความต้านทานเชื้อ ส่วนที่ระดับความเข้มข้นอื่นๆไม่พบว่าสามารถป้องกันการเกิดโรคได้ ส่วนการทดลองในหลอดทดลอง (*In vitro*) พบว่า β-glucan สามารถกระตุ้นแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในเม็ดเลือดกุ้งได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Jogensen และคณะ (1993) ที่พบว่า β-glucan สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของการกำจัดแบคทีเรีย การผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิ

ออน ของแมคโครฟาจ และ แอคทิวิตี้ของเอนไซม์ไลโซไซม์ Itami และคณะ (1993) รายงานว่าสารเพปทิโดกลัยแคนซึ่งเป็นรูปแบบหนึ่งของ β-glucan สามารถที่จะเพิ่มประสิทธิภาพในการต้านทานโรคของกุ้ง kuruma และสามารถเพิ่มอัตราการเกิดฟาโกซัยติค แอคทิวิตี้ให้เพิ่มมากขึ้นด้วย

ผลการวิเคราะห์ค่าความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือดบนอาหาร PCA และ TCBS ที่ 10, 20 และ 30 วันระหว่างกลุ่มที่แช่วัคซีนและกลุ่มควบคุมไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ นอกจากบนอาหาร TCBS ที่ 30 วัน โดยผลการทดลองพบว่าค่าความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือดบนอาหาร TCBS ของกลุ่มที่แช่วัคซีนมีค่ามากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง การที่ไม่พบความแตกต่างของค่าความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือดของกลุ่มที่แช่วัคซีนและกลุ่มควบคุมอาจเกิดเนื่องจากระหว่างการทดลองสภาพภูมิอากาศมีการแปรปรวน ทำให้อุณหภูมิของน้ำที่เลี้ยงกุ้งทดลองมีการเปลี่ยนแปลงขึ้นลงอยู่เสมอ จึงเป็นสาเหตุให้กุ้งทดลองชุดที่จะใช้สำหรับการวิเคราะห์ค่าความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือดเกิดความเครียดและเกิดการติดเชื้อแบคทีเรียในบางตัวของกลุ่ม Robert (1989) รายงานว่าความเครียดมีผลทำให้การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำลดลง โดยจะส่งผลต่อระบบสรีระและพฤติกรรมที่แสดงออกมา ถ้าหากความเครียดนั้นมีความรุนแรงจะทำให้สัตว์น้ำเกิดการติดเชื้อโรคได้ง่าย ดังนั้นผลการทดลองครั้งนี้จึงมีค่าความแปรปรวนของจำนวนแบคทีเรียในน้ำเลือดสูง ส่งผลให้เมื่อทำการเปรียบเทียบทางสถิติ จึงไม่มีความแตกต่างระหว่างชุดที่ได้รับวัคซีนและกลุ่มควบคุม

ผลของประสิทธิภาพของวัคซีนที่ใช้โดยวิธีแช่ พบว่าที่ 10, 20 และ 30 วันมีค่า RPS เท่ากับ 57.14, 50 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งยังถือว่ามีประสิทธิภาพที่ไม่สูงนัก เพราะยังมีค่าต่ำกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ อาจเกิดเนื่องจากการแช่เป็นวิธีการที่วัคซีนเข้าสู่ตัวกุ้งได้น้อยนอกจากการซึมผ่านทางเหงือกและเข้าทางปาก ซึ่งเหงือกกุ้งมีสารประกอบไคตินหุ้มอยู่โอกาสที่วัคซีนจะสามารถซึมผ่านได้ก็มีน้อยและส่วนที่เข้าสู่ตัวกุ้งทางปากจะผ่านทางเดินอาหารเป็นหลัก ทำให้กุ้งทดลองไม่สามารถได้รับวัคซีนได้อย่างเต็มที่ ผลของประสิทธิภาพของวัคซีนจึงไม่ดีเท่าที่ควร แต่ก็พบว่าอัตราการตายของกุ้งกลุ่มที่ได้รับวัคซีนก็ไม่เกินครึ่งหนึ่งของอัตราการตายของกลุ่มควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Itami และคณะ (1989) ซึ่งได้ทำการทดลองให้วัคซีนเชื้อแบคทีเรียที่ถูกฆ่าด้วยฟอร์มาลินเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำ

มาให้กุ้งทดลองด้วยวิธีการแช่กุ้งลงในวัคซีนเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้น 30 วัน ทำการทดสอบความต้านทานเชื้อโดยวิธีการฉีดเชื้อ พบว่ากุ้งกลุ่มที่ได้รับวัคซีนมีอัตราการตายต่ำกว่าครึ่งหนึ่งของกลุ่มควบคุม คือมีอัตราการตาย 28.6 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีอัตราการตาย 78.9 เปอร์เซ็นต์

2.3 วิธีการให้วัคซีนด้วยวิธีฉีด

จากผลการใช้วัคซีนด้วยวิธีการฉีดโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.1 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกลุ่มควบคุมฉีดน้ำเกลือปลอดเชื้อเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสของกลุ่มที่ได้รับวัคซีนกับกลุ่มควบคุมไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ 10 และ 20 วัน ส่วนที่ 30 วัน พบว่ากลุ่มที่ได้รับวัคซีนมีค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสของกลุ่มที่ได้รับวัคซีนมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นได้เนื่องจากการกระตุ้นระบบโปรพีโอด้วยวิธีการฉีดอาจต้องการระยะเวลาในการกระตุ้นระบบโปรพีโอให้มีความว่องไวมากขึ้น ซึ่งจะเห็นได้ว่าค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสของกลุ่มที่ได้รับวัคซีนมีค่าเพิ่มมากขึ้นจาก 10, 20 และ 30 วัน โดยกลุ่มที่ได้รับวัคซีน 0.1 เปอร์เซ็นต์ มีค่า 199.19, 233.11 และ 290.78 ส่วนกลุ่มที่ได้รับวัคซีน 0.25 เปอร์เซ็นต์ มีค่า 178.22, 285.87 และ 305.14 unit/min/mg protein ตามลำดับ อย่างไรก็ตามจากการใช้ค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสเป็นพารามิเตอร์ในการวัดการตอบสนองของภูมิคุ้มกันของกุ้งในการวิจัยครั้งนี้ทั้งในวิธีการกิน การแช่ และ การฉีด พบว่าค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส มีการตอบสนองที่ไม่รวดเร็วนักต่อการใช้วัคซีนในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ทั้งนี้อาจเกิดเนื่องมาจากชนิดของเม็ดเลือดที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นระบบโปรพีโอให้หลั่งเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสออกมาดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น และอาจเกิดจากการทดลองโดยใช้วัคซีนครั้งนี้ในการกระตุ้นระบบโปรพีโอต้องการระยะเวลาค่อนข้างนานในการกระตุ้นให้ระบบโปรพีโอมีความว่องไวมากขึ้น และเมื่อระบบถูกกระตุ้นให้ว่องไวแล้วไม่สามารถคงอยู่ได้นาน จึงทำให้ผลการเปรียบเทียบค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสระหว่างกลุ่มที่ได้รับวัคซีนและกลุ่มควบคุมไม่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน

ผลการเปรียบเทียบปริมาณการผลิต ซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน พบว่ากลุ่มที่ได้รับวัคซีนเข้มข้น 0.1 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณการผลิต ซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ที่ 10, 20 และ 30 วันหลังจากได้รับวัคซีนและค่าความ

สามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือดบนอาหาร PCA และ TCBS พบว่ากลุ่มที่ได้รับวัคซีนมีความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือดสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ที่ 10, 20 และ 30 วันหลังจากได้รับวัคซีน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการให้วัคซีนด้วยวิธีการฉีดนี้สามารถกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันที่กำจัดสิ่งแปลกปลอมด้วยวิธีการฟาโกซัยโทซิส มีประสิทธิภาพสูงมากขึ้น ทำให้มีปริมาณการผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน ที่เพิ่มมากขึ้นและมีความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือดสูงกว่ากลุ่มควบคุม แต่จะเห็นได้ว่าค่าซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน และค่าความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือดจะมีค่าต่ำลงในช่วงการวิเคราะห์วันที่ 30 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า วัคซีนที่กุ้งได้รับโดยวิธีฉีดนี้ สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ในระยะเวลาที่ไม่นานนัก ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Keith และคณะ (1992) ซึ่งได้ทดลองฉีดเชื้อ *Aerococcus viridans* var.*homori* ที่เป็นสาเหตุของโรค gaffkemia ในกุ้ง american lobster พบว่าการให้วัคซีนด้วยวิธีฉีดนี้สามารถป้องกันการเกิดโรค gaffkemia ได้ดีที่สุดหลังจากได้รับวัคซีนเป็นเวลา 32 วันหลังจากนั้นประสิทธิภาพของวัคซีนจะมีค่าต่ำลงเช่นเดียวกัน

ผลของประสิทธิภาพของวัคซีนที่ใช้โดยวิธีการฉีดนี้พบว่าที่ 10, 20 และ 30 วัน กลุ่มที่ได้รับวัคซีนเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ มีค่า RPS เท่ากับ 70, 87.50 และ 67 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกลุ่มที่ได้รับวัคซีนเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ มีค่า RPS เท่ากับ 70, 87.50 และ 83.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งถือได้ว่าการใช้วัคซีนด้วยวิธีการฉีดครั้งนี้มีประสิทธิภาพสูง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Itami และคณะ (1989) ที่ทำการให้วัคซีนแก่กุ้งทดลองด้วยวิธีการฉีดวัคซีนเชื้อ *Vibrio* sp NU-1 ความเข้มข้น 9.5 x 10^8 cell/ml หลังจากนั้น 30 วันจึงนำมาทดสอบความต้านทานเชื้อซึ่งพบว่ากลุ่มที่ได้รับวัคซีนมีอัตราการตาย 31.3 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีอัตราการตาย 78.9 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาผลการให้วัคซีนด้วยวิธีฉีดในสัตว์กลุ่มครัสเตเชี่ยนอื่นๆ ซึ่งพบว่าวิธีการให้วัคซีนด้วยวิธีการฉีดนี้มีประสิทธิภาพสูงและสามารถป้องกันการเกิดโรคอย่างได้ผล เช่นในกุ้งน้ำจืด *Parachaeraps bicarinatus* (McKay and Jenkin, 1969, 1970) และในกุ้ง american lobster (Stewart and Zwicker, 1972, 1974 ; Mori and Stewart, 1978) โดยใช้วัคซีนที่ผลิตจากเชื้อ *Pseudomonas* sp. และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบประเภท enteric bacteria วิธีการให้วัคซีนด้วยวิธีการฉีดไม่เหมาะสมต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งจำนวนมากๆ ในภาคสนาม

เพราะเป็นการยากในการปฏิบัติ แต่วิธีการฉีดแสดงให้เห็นว่าถ้ากุ้งทดลองได้รับวัคซีนนี้อย่างเต็มที่ในปริมาณที่เหมาะสมก็จะสามารถกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพได้ ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาวิธีการให้ในรูปแบบอื่นๆ ที่จะสามารถทำให้กุ้งได้รับวัคซีนได้เต็มปริมาณที่ต้องการให้ได้มากที่สุด

เนื่องจากการศึกษาการใช้วัคซีนในกุ้งยังมีไม่มากนักรวมถึงการใช้พารามิเตอร์ต่างๆ ในการวัดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งยังไม่เป็นที่แพร่หลาย โดยส่วนใหญ่จะตรวจสอบผลของวัคซีนโดยดูจากอัตราการรอดตายที่เพิ่มขึ้น ทำให้ในการทดลองครั้งนี้ไม่มีรายงานการศึกษาของผู้วิจัยอื่นๆ มาเปรียบเทียบในพารามิเตอร์เดียวกันมากนัก ดังนั้นในการพัฒนาการผลิตวัคซีนเพื่อใช้ในกุ้ง จึงยังต้องการข้อมูลการศึกษาถึงผลการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันเมื่อใช้วัคซีนเป็นตัวกระตุ้นอีกจำนวนมาก เพื่อให้วัคซีนที่จะนำมาใช้เกิดประสิทธิภาพได้อย่างแท้จริง จึงจะสามารถช่วยลดปัญหาที่เกิดจากการติดเชื้อโรคในกุ้งได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไปในอนาคต

บทที่ 5

สรุป

1. การผลิตวัคซีนเชื้อแบคทีเรียในการทดลองครั้งนี้ ใช้เชื้อที่แยกได้จากกุ้งกุลาดำที่ป่วยเป็นโรคเรืองแสง จากนั้นทำการจำแนกชนิดของเชื้อโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และ คุณสมบัติทางชีวเคมีพบว่าคือเชื้อ *Vibrio harveyi* แล้วจึงนำเชื้อชนิดนี้ไปผลิตเป็นวัคซีน โดยเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียในอาหารเหลวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงเก็บเซลล์ที่เลี้ยงนำไปทำให้เซลล์แตก จากนั้นนำไปทำการแช่แข็งแห้ง เพื่อผลิตเป็นวัคซีนผง

2. การให้วัคซีนด้วยวิธีกิน พบว่าอาหารที่ผสมวัคซีนที่ระดับ 0.1, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งให้ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น แต่ค่า RPS ของวัคซีนมีค่าต่ำกว่า 60 เปอร์เซ็นต์

3. การให้วัคซีนด้วยวิธีแช่ พบว่าสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกลุ่มที่ได้รับวัคซีนให้เพิ่มมากขึ้นได้ในบางพารามิเตอร์ และเห็นการตอบสนองชัดเจนมากขึ้นเฉพาะการวิเคราะห์ที่ 20 วัน ซึ่งเป็นช่วงที่ห่างจากการแช่วัคซีนครั้งที่ 2 เพียง 6 วัน แสดงให้เห็นว่าการให้วัคซีนด้วยวิธีแช่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้มีค่าความว่องไวมากขึ้นในระยะเวลาสั้นๆเท่านั้น

4. การให้วัคซีนด้วยวิธีฉีด พบว่าเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสูง สามารถกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันทำงานได้อย่างดี และช่วยลดอัตราการตายของกุ้งที่ติดเชื้อเรืองแสงได้ โดยมีค่า RPS ของวัคซีนสูงกว่า 60 เปอร์เซ็นต์จึงแสดงให้เห็นว่าการให้วัคซีนด้วยวิธีฉีดนี้สามารถป้องกันการเกิดโรคเรืองแสงได้อย่างมีประสิทธิภาพ

5. จากการเปรียบเทียบวิธีการให้วัคซีนทั้ง 3 วิธี พบว่าวิธีการฉีดเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันมากที่สุด ส่วนวิธีกินและแช่มีประสิทธิภาพในกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในระดับที่ใกล้เคียงกัน

เอกสารอ้างอิง

กิจการ ศุภมาตย์ และ สิทธิ บุณยรัตผลิน. 2538. การศึกษาภูมิคุ้มกันโรคและแนวทางการใช้วัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อแบคทีเรียและไวรัสในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) รายงานการวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. หน้า 1-17.

ดารุณี แซ่อุ่ย, อนันต์ ตันสุตะพานิช และ ลิลา เรืองแป้น . 2530. *Vibrio harveyi* สาเหตุของโรคแบคทีเรียเรืองแสงของลูกกุ้งแชบ๊วย (*Penaeus merguiensis*). ว.การประมง. 40(2) : 177-182.

ฝ่ายสถิติและสารสนเทศการประมง. 2538. สถิติการประมงแห่งประเทศไทยปี พ.ศ. 2538. กองเศรษฐกิจการประมง กรมประมง. 80 หน้า

มณเฑียร ส่งเสริม, บัญญัติ สุขศรีงาม และ ประภาศิริ ศรีโสภาภรณ์. 2533. การศึกษาแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคเรืองแสงในกุ้งกุลาดำ. ว. ศรีนครินทรวิโรฒวิจัยและพัฒนา. 4(1) : 15- 24.

มะลิ บุณยรัตผลิน, จารุรัตน์ วรรณโกวัฒน์, ชูศักดิ์ บริสุทธิ์ และ สุจินต์ บุญช่วย. 2537. ผลของแคนตาแซนตินและแอสตาแซนตินที่ระดับต่างๆ ต่อสีของกุ้งกุลาดำ.เอกสารวิชาการฉบับที่ 18/2537 สถาบันเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จังหวัดสงขลา กรมประมง. 11 หน้า

สุวณี สุภเวชย์ . 2536. รูปพรรณ โครงสร้างและหน้าที่ ใน แบคทีเรียพื้นฐาน . โรงพิมพ์ยอดศิริ กรุงเทพฯ . 248 หน้า

Anderson, A .J. and Archibald, A.R. 1975. Poly (glucosylglycerol phosphate) teichoic acid in the walls of *Bacillus stearothermophilus* B65. Biochem. J. 151 : 115-120.

Baticados, M.C.L., Lavilla-Pitogo, L.R., Kryz-Laciera, E.R., De la Pena, L.D. and Sunaz, N.A. 1991. Studies on the chemical control of luminous bacteria

V. harveyi and *V. splendidus* isolated from diseased *Penaeus monodon* larvae and rearing water. Dis. Aquat. Org. 9 : 133-139.

Baumann, P., Furniss, A. L. and Lee, J.V. 1984. Section 5 facultatively anaerobic gram-negative rods. genus I *Vibrio pacini* 1854, 411.[AL] In Bergey's Manaul of Systematic Bacteriology. (eds. Krieg, N.R. and Holt, J.G.) Vol.1, pp.518-538, Baltimore : Williams and Wilkins.

Bell, K.L. and Smith, V.J. 1993. In vitro superoxide production by hyaline cells of the shore crab *Carinus maenas (L)*. Dev. Com. Immu. 17 : 211-219.

Boonyaratapalin, S., Boonyaratapalin, M., Supamattaya, K. and Toride, Y. 1995. Effects of peptidoglycan (PG) on growh, survival,immune response, and tolerance to stress in black tiger shrimp, Penaeus monodon.In Diseases in Asian Aquaculture II . (eds. Shariff, M., Arthur, J.R. and Subasinghe, R.P.) pp. 469-477. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila.

Burnell, E., Van Alphen, L., Verkleij, A., De Kruijff, B. and Lugtenberg, B. 1980.[31]P nuclear magnetic resonance and freeze-fracture electron microscopy studies on *Escherichia Coli* iii: the outer membrane . Biochem. Biophys . Acta. 597 : 519-532.

Chen, S. N., Huang, S.L. and Kou, G.H. 1992. Studies on epizootiology and pathogenicity of bacterial infections in cultured giant tiger prawns ,*Penaeus monodon*, in Taiwan. In Disease of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and The United State. (eds. Fulks, W. and Main, K.L.) pp.195-208, Hawii : The Oceanic Institute.

Duncan, D.W. 1955. Multiple-range and multiple F-tests. Biometrics. 11 : 1-42.

Ellis, A.E. 1988. Fish Vaccination. Academic press limited London. 253 p.

Evans, E.E., Painter, B., Evans,M.L., Weinheimer, P. and Acton, R.T. 1968. An induced bacteridin in the spiny lobster, *Panulirus argus*. Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine.128 : 394-398

Goldenberg, P.Z.,Huebner, E. and Greenberg, A.H. 1984. Activation of lobster haemocytes for phagocytosis. J. Invertebr. Pathol. 43 : 77 - 88

Hancock, I.C. and Poxton, I.R. 1988. Bacterial Cell Surface Technique. Wiley-Interscience Publication, Chichester John Wiley & sons. 329 p.

Hose, J.E. and Matin, G.G. 1989. Defense reactions in the ridgeback prawn *Sicyonia inginti*. J. Invertebr. Pathol. 53 : 335-346.

Itami, T., Takahashi, Y. and Nakamura, y.1989.Efficacy of vaccination against Vibriosis in cultured Kuruma prawns *Penaeus japonicus*. J. Aquat. Anim. Health. 1: 238 - 242

Itami, T. and Takahashi, Y. 1991.Survival of larval Giant Tiger prawn *Penaus monodon* after addition of killed Vibrio cells to a microencapsulated diet.J. Aquat. Anim. Health. 3 : 151 - 152

Itami, T., Yan, Y. and Takahashi, Y. 1992a .Study vaccination against Vibriosis in cultured Kuruma prawn *Penaeus japonicus* I.; effect of vaccne concentration and duration of vaccination efficacy. J. Shimonoseki University of fisheries 40(2) : 83 - 87.

Itami, T., Yan, Y. and Takahashi, Y.1992b. Study vaccination against Vibriosis in cultured Kuruma prawn *Penaeus japonicus* II : effect of differrent vaccine preparations and oral vaccination efficacy. J. Shimonoseki University of fisheries 40 (3) : 238 - 242.

Itami, T., Takahashi, Y., Tsuchihira, E., Igusa, H. and Kondo., M. 1993. Enhancement of disease resistance of kuruma prawn,*Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan.Aquatic Animal Health and Environment. Abstract of Second Symposium on Disease in Asian Aquaculture. p.6

Jiravanichpaisal, P., Miyazaki, T. and Limsuwan, C. 1994. Histopathology, biochemistry and pathogenicity of *V. harveyi* infecting black tiger prawn. J. Aquat. Anim. Health 6 : 27-35.

Jiravanichpaisal, P., Miyazaki, T., Limsuwan, C. and Somjetlerdchalern, A. 1995. Comparative histopathology of Vibriosis in black tiger shrimp. *Penaeus mondon*.In Diseases in Asian Aquaculture II . (eds. Shariff, M., Arthur, J.R. and Subasinghe, R.P.) pp. 123-130. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila.

Johansson, M.W. and Soderhall, K. 1989. Cellular immunity in crustacean and the pro -PO system. Parasit. Today. 5 : 171-176.

Jomori, T., Kubo, T., and Natori, S. 1990. Purification and characterization of lipopolysaccharide binding protein from haemolymph of American cockroach *Periplaneta americana*. Eur. J. Biochem. 190 :201-206

Jorgensen, J.B., Sharp, G.J.E., Secombes, C.J. and Robertsen, B. 1993. Effect of yeast-cell-wall glucan on the bactericidal activity of rainbow trout macrophages. Fish and Shellfish Immunol.3 : 267-277

Karunasagar, I., Pai, R., Malathi, G.R. and Karunasagar, I. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistance *V. harveyi* infection. Aquaculture 128 : 203-209.

Keith, I.R., Paterson, W.D., Airdrie, D. and Boston, L.D. 1992. Defence mechanisms of the American lobster, (*Homarus americanus*) : vaccination provided protection against gaffkemia infections in laboratory and field trials. Fish and Shellfish Immunol. 2 : 109-119

Knaap, W. V.D.. 1993. Defence in Invertebrate in Biotol (biotechnology by open learning. Butterworth-Heinemanm LTD. Linaese Honse, Jordan Hill., Oxford.215 p.

Kondo, M., Itami, T. and Takahashi, Y.. 1992. The phenoloxidase activity in prawn haemocytes. J. Gyobyo Kenkyu 27 (4) : 185 - 189.

Lavilla - Pitogo, C.R., Baticados, M.C.L., Lruz-Lalierda, E.R. and De la Pena, L.D. 1990. Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. Aquaculture 91 : 1-13.

Lavilla - Pitogo, L.R. 1995. Bacterial diseases on penaeid shrimps : an Asian view . In Diseases in Asian Aquaculture (eds. Shariff, M., Arthur, J.R. and Subasinghe, R.P.) pp. 107-121. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila.

Le Groumellec, M., Haffner, P., Martin, B. and Martin, C. 1995. Comparative study of bacteria infections responsible for mass mortality in penaeid shrimp hatcheries of the Pacific zone. In Diseases in Asian Aquaculture II. (eds. Shariff, M., Arthur, J.R. and Subasinghe, R.P.) pp. 163-173. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila.

Lewis, D.H. 1973. Response of brown shrimp to infection with *Vibrio sp.* Proceedings of the 4th Annual Workshop World Mariculture Society, pp. 333-338.

Lightner, D.V. 1988. Vibrio disease of penaeid shrimp . In Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture. (eds. Sindermann, L.J. and Lightner, D.V.) pp. 42-47, New York : Elsevier Science Publishing Company Inc.

Lightner, D.V. 1993. Diseases of cultured penaeid shrimp. In CRC Handbook of Mariculture 2nd ed. Vol.1 Crustacean Aquaculture.(ed. McVey, J.P.) pp. 393-486,Florida : CRC Press, Inc.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265-275.

MacFaddin, J.F. 1980. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. 2nd ed. Baltimore : Williams and Wilkins. 522 p.

Maramorosch, K. and Shope, R.E. 1975. Invertebrate Immunity. Academic Press, Inc. London. 365 p.

Martin, G.G., Poole, D., Poole, C., Huse, J.E., Arias, M., Reynolds, L., Mckrell, N. and Whang, A. 1993. Clearance of bacteria injected into the haemolymph of the penaeid shrimp, *Sicyonia ingentis*. J. Invertebr. Pathol. 62 : 308-315.

McKay, D. and Jenkin, C.R. 1969. Immunity in the invertebrates II.Adaptive immunity in crayfish *Parachaeraps bicarinatus*.Immunology 17 : 127-137

McKay, D. and Jenkin, C.R. 1970. Immunity in the invertebrates.Corelation of the phagocytic activity of haemocytes with resistance to infection in crayfish (*Parachaeraps bicarinatus*).Australian J. Experimental Biology and Medical Science 48 : 609-617

Mori, K. and Stewart, J.E. 1978. Natural and induced bactericidal activity of the hepatopancreas of the American lobster (*Homarus americanus*). J. Invertebr. Pathol. 32 : 171-176

Paterson, W.D., Stewart, J.E. and Zwickner, B.M.1976. Phagocytosis as a cellular immune response mechanism in the American lobster,*Homarus americanus*. J. Invertebr. Pathol. 27 : 95 - 104.

Reed, L.J. and Muench, H. 1938. A simple method of estimating fifty per cent end points. Am. J. Hyg. 27 ; 493-497.

Robert,R.J. 1989.Fish Pathology.Institute of aquaculture.University of stering, Scotland. 467 p

Ruangpan, L., Tabkaew, R. and Sangrungruang, K. 1995a. Bacterial flora of ponds with different stocking densities of black tiger shrimp, *Penaeus monodon* In Diseases in Asian Aquaculture II. (eds. Shariff, M., Arthur, J.R. and Subasinghe, R.P.) pp. 141-149. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila.

Ruangpan, L., Tabkaew, R., Yoshida, T., Kawatsu, H. and Saitanu, K. 1995b. Numerical taxonomy of *Vibrio spp.* isolated from black tiger shrimp, *Penaeus monodon* cultured in Thailand. In Diseases in Asian Aquaculture II. (eds. Shariff, M., Arthur, J.R. and Subasinghe, R.P.) pp. 141-149. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila.

Smith, V.J. and Ratcliffe, N.A.. 1980. Cellular defense reactions the shore crab. *Carinus maenas*. J. Invertebr. Pathol. 35 : 65 - 74.

Soderhall, K., Rogener, W., Newton, R.P. and Ratcliffe, N.A..1988. The properties and purification of a *Blaberus craniifer* plasma protein which enhances

the activation of haemocyte prophenoloxidase by a β-1,3-glucan. Insect Biochem. 18 : 322-330.

Soderhall, K. and Cerenius, L. 1992. Crustacean immunity. Annu. Rev. of Fish Dis. 2 : 3-23.

Stewart, J.E. and Zwicker, B.M. 1972. Natural and induced bacterial activities in the haemolymph of the lobster,*Homarus americanus* : products haemocyte-plasma interaction. Canadian J. Microbiology 18 : 1499-1509.

Stewart, J.E. and Zwicker, B.M. 1974.Comparison of various vaccines for inducing resistance in the lobster *Homarus americanus* to the bactrial infection, gaffkemia. J. Fisheries Research Board of Canada. 31 : 1887-1892

Sung, H.H., Yang, Y.L. and Song, Y.L. 1996. Enhancement of microbicidal activity in the black tiger prawn *Penaeus monodon* via immunostimulation. J. Crust. Bio. 16 (2) : 278-284

Sung, H.H., Yang, Y.L. and Song, Y.L. 1994. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*) Fish Patho. 29 (1) : 11-17

Takahashi, H., Komano, H., and Natori, S. 1986. Experiment of the lectin gene in *Sarcophaga peregrina* during normal development and under conditions where the defence mechanism in activated. J. Insect Physiol. 32 : 771-779

Taku, A. and Fan, D.P. 1979. Dissociation and reconstitution of membranes synthesising the peptidoglycan of *Bacillus megaterium*. J. Biol. Chem. 254 : 3991-3999.

Tsing, A., Arcier, J.M. and Brehelin, M.1989. Haemocytes of penaeid and palaemonid shrimps:morphology, cytochemistry and haemograms. J. Invertebr. Pathol. 53 : 64 -77.

Unstrem, T. and Soderhall, K..1977. Soluble and fracments from fungal cellwalls elicit defence reaction in crayfish. Nature 267 : 45 - 46.

Vera, P., Navas, J.I. and Quintero, M.C. 1992. Experimental study of the virulence of three species of *Vibrio* bacteria in *Penaeus japonicus (Bate 1881)* juveniles. Aquaculture 107 : 119-123.

Waterman, T.H. 1960. The Physiology of Crustacea. Academic Press. New York, London. 668 pp

Weinheimer, P.F., Acton, R.T., Sawyer, S. and Evans, E.E. 1969. Specificity of the induced bactericidin of the West Indian Spiny Lobster, *Panulirus argus*. J. Bacteriology 98 : 947-948.

Wickus, G.G. and Strominger, J.L. 1972. Penicillin- sensitive transpeptidation during peptidoglycan biosynthesis in cell-free preparations from *Bacillusmegaterium*. J. Biol. Chem. 247 : 5297-5306.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก สูตรอาหาร

1.K-199 100 ml (ดัดแปลงจาก Kondo *et al.*, 1992)ประกอบด้วย

M-199	50	ml
hepes	0.238	g
$MgCl_26H_2O$	0.33	g
$MgSO_4\ 7H_2O$	0.3	g
NaH_2PO_4	0.005	g
NaCl	1.1	g
$CaCl_2\ 2H_2O$	0.09	g
L-glutamine	1	ml

เติมน้ำ deionized จนครบ 100 ml ปรับ pH ให้ได้ 7.6 กรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 µm เก็บไว้ในตู้เย็น

2. KR-199 100 ml (ดัดแปลงจาก Kondo *et al.*, 1992) ประกอบด้วย

M-199	50	ml
NaCl	1	g
glucose	0.2	g
L-glutamine	1	ml
hepes	0.119	g

เติมน้ำ deionized จนครบ 100 ml ปรับ pH ให้ได้ 7.6 กรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 µm เก็บไว้ในตู้เย็น

ตารางภาคผนวกที่ ก1 สูตรอาหารผสมวัคซีน 4 ระดับคือ 0, 0.1, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ (ดัดแปลงจากมะลิ บุณยรัตผลิน และคณะ, 2537)

องค์ประกอบ (g)	สูตรที่ 1 (ชุดควบคุม)	สูตรที่ 2 (vaccine 0.1%)	สูตรที่ 3 (vaccine 0.5%)	สูตรที่ 4 (vaccine 1.0%)
ปลาป่น	250	250	250	250
ปลาหมึก	50	50	50	50
หัวกุ้ง	100	100	100	100
กากถั่ว	100	100	100	100
หวีดกลูเต็น	60	60	60	60
แป้งสาลี	200	200	200	200
วิตามินมิกซ์	4.3	4.3	4.3	4.3
แร่ธาตุ	40	40	40	40
วิตามินซี	1	1	1	1
zeolite	15	15	15	15
fish oil	20	20	20	20
lectin	20	20	20	20
BHT	0.2	0.2	0.2	0.2
chlorine-Cl	3.0	3.0	3.0	3.0
chloresterol	5.0	5.0	5.0	5.0
แป้งข้าวเจ้า	101.5	100.5	96.5	91.5
รวม (g)	1,000	1,000	1,000	1,000

แร่ธาตุประกอบด้วย : $CaH_2PO_42H_2O$ 10 g ; NaH_2PO_4 15 g ; KH_2PO_4 10 g ; Kcl 5 g

วิตามินซีประกอบด้วย : APMg 0.5 g ; C-70 0.5 g

ภาคผนวก ข วิธีการวิเคราะห์

1. ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อโดยวิธี Disc Diffusion Method (MacFaddin, 1980)

นำเชื้อ *V. harveyi* โคโลนีเดี่ยว ที่เจริญบนอาหาร Tryptic Soy Agar ละลายในน้ำเกลือปลอดเชื้อเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ให้ได้ความทึบแสงเท่ากับสารละลาย MacFaland มาตรฐานเบอร์ 0.5 จากนั้นใช้ก้านสำลีที่ปลอดเชื้อจุ่มลงในสารละลายเชื้อ *V. harveyi* แล้วนำไปเกลี่ยลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Muller Hinton Agar ให้ทั่วจานเพาะเชื้อ จากนั้นนำ disc ยาชนิดต่างๆ วางลงบนอาหาร Muller Hinton Agar ที่เกลี่ยด้วยสารละลายเชื้อ *V. harveyi* บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วจึงวัดวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น จากนั้นแปลผลโดยใช้ตารางมาตรฐานในการแปลผลความไวต่อยาปฏิชีวนะ

2. แอคทิวิตี้ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (ดัดแปลงจาก Soderhall *et al.*, 1988)

อุปกรณ์

1. เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ
2. สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)
3. เครื่องอุลตร้าโซนิค ฮอโมจิไนซ์เซอร์ (ultrasonics homoginizer)

สารเคมี

1. K-199
2. cysteine
3. cacodylate buffer (CAC buffer)

   ละลาย sodium - cacodylate 1.07 g ใน น้ำ deionized ปลอดเชื้อ 500 ml เติม calcium chloride 0.37 g ปั่นให้ละลายแล้วจึงเติม megnesium chloride 5.08 g ปรับ pH ให้ได้ 7.0 เก็บแช่เย็น

4. trypsin

   ละลาย trypsin 0.001 g ใน CAC buffer 1 ml

5. L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)

ละลาย L-DOPA 0.003 g ใน CAC buffer 1 ml

วิธีการ

1. เตรียม k-199 ผสมกับ cysteine 30 mg/ml ปรับ pH ให้ได้ 7.6 จากนั้นดูดใส่เข็มฉีดยาขนาด 1 ml และใช้หัวเข็มฉีดยาขนาด 24 G ความยาว 12 mm เก็บตัวอย่างเลือดกุ้ง โดยใช้เข็มฉีดยาที่เตรียมไว้เจาะเลือดที่โคนขาเดินคู่ที่ 3 นำเลือดที่ได้ 0.5 ml ผสมให้เข้ากันแล้วใส่ใน microtube นำเลือดกุ้งที่ได้ไปเหวี่ยงให้ตกตะกอน (centrifuge) ความเร็ว 2,832.4 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นดูดส่วนเหลวทิ้ง เติม k-199 แล้วผสมให้เข้ากันเบาๆนำไปเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ 2,832.4 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ดูดส่วนใสทิ้งแล้วแช่ช่องแข็ง โดยใส่ CAC buffer 1 ml นำไป sonicate ที่ amplitude ระดับ 30 เป็นเวลา 20 วินาที นำไปเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ 11,329.6 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

2. นำส่วนใสไปวัดค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส โดยเติม trypsin 200 µl/หลอด จากนั้นเติมตัวอย่างลงในหลอดๆ ละ 200 µl ส่วนในหลอดที่เป็น blank เติม CAC buffer 200 µl เติม L-DOPA 200 µl/หลอด ทิ้งไว้ 2 นาทีแล้วจึงเติม CAC buffer 1,800 µl ทิ้งไว้ 2 นาที นำไปวัดค่าความทึบแสงที่ 490 nm โดยบันทึกค่าความทึบแสงที่เปลี่ยนแปลงทุก 2 นาที

3. วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในเม็ดเลือดเปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีนมาตรฐาน (Lowry *et al.*, 1951) นำผลที่ได้มาคำนวณค่า phenoloxidase activity โดยมีหน่วยเป็น unit/min/mg protein

3. ปริมาณการผลิต ซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน (ดัดแปลงจาก Bell and Smith, 1993)

อุปกรณ์

1. เครื่องหมุนเหวี่ยง
2. ELISA (enzyme-linked immonusorbent assay) reader
3. กล้องจุลทรรศน์และฮีมาโตไซโทมิเตอร์ (haematocytometer)

สารเคมี

1. zymosan A
2. trypan blue solution 0.15%

เตรียมใน sodium chloride 2.6% โดยละลาย sodium chloride 2.6 g/น้ำกลั่น 100 ml แล้วจึงเติม trypan blue 0.15 g ใช้แท่งแม่เหล็กกวนให้ละลายประมาณ 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยง 6,703.9 g เป็นเวลา 10 นาที กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 µm ดูดใส่ microtube หลอดละ 450 µl เก็บในตู้เย็น

3. 70% methanal
4. 2M potassiumhydroxide (KOH)
5. dimethyl sulfoxide (DMSO)
6. nitro blue tetrazolium (NBT)
7. cysteine

วิธีการ

1. การเตรียม opsonized zymosan โดยการนำเม็ดเลือดกุ้ง 2 ml ใส่ใน microtube ที่ไม่ได้ใส่ cysteine จากนั้นนำไป homoginized แล้วจึงนำไปเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 6,703.9 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสแล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 µm จากนั้นจะได้ serum นำ zymosan 5 mg มาผสมกับ serum 500 µl นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงไปเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 1,676 g ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที นำตะกอนมาล้างด้วย KR-199 โดยใช้ KR-199 1 ml แล้วผสมให้เข้ากัน จากนั้นให้นำไปเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 1,676 g ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ล้าง 3 ครั้ง จากนั้นละลายตะกอนด้วย KR-199 ปริมาตร 1 ml เก็บในช่องแช่แข็ง

2. การเตรียม monolayer โดยดูดเลือดกุ้งทดลองใส่หลอดฉีดยาที่มี cysteine 0.2 ml จากนั้นดูดใส่ microtube ไว้ แล้วดูดเลือดที่ผสม cysteine 50 µl ใส่ใน trypan blue นำไปนับจำนวนเซลล์ ด้วย haematocytometer ให้ได้ $1x10^{7}$ cell/ml โดยใช้ KR-199 เป็นตัวเจือจาง หลังจากเจือจางให้ได้ปริมาณเม็ดเลือดที่ต้องการแล้วจึงดูดใส่ microwell ตัวอย่างละ 6 หลุม ให้ได้ปริมาตร 200 µl/well จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30

นาที แล้วจึงล้างด้วย KR-199 3 ครั้ง ครั้งละ 200 µl/well เพื่อล้าง superoxide ที่ถูกสร้างภายนอกเซลล์ออกไป แล้วเติม KR-199 100 µl ทุก well เติม reaction mixture 100 µl/well ซึ่ง reaction mixture มี 2 ชนิดคือ ชนิดที่ใส่ opsonized zymosan และ ชนิดที่ไม่ใส่ opsonized zymosan โดยจะใส่ reaction mixture ชนิดละ 3 หลุม/1ตัวอย่าง ทิ้งไว้ 60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงล้างด้วย KR-199 3 ครั้ง ครั้งละ 200 µl/well แล้ว fix ด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ methanol 3 นาที ทิ้งไว้ให้แห้ง เติม 2M KOH 120 µl/well เพื่อละลายในผนังเซลล์ จากนั้นเติม DMSO 140 µl/well เพื่อละลาย complex ที่เกิดจาก NBT กับ superoxide นำไปวัดค่าความทึบแสงที่ 620 nm (blank คือ 2M KOH + DMSO) นำผลที่ได้มาคำนวณปริมาณ ซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน จากสูตร

ปริมาณ ซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน (unit) = (ค่าความทึบแสงของหลุมที่ใส่ reaction mixture ชนิดที่มี opsonized zymosan - ค่าการความทึบแสงแสงของหลุมที่ใส่ reaction mixture ชนิดที่ไม่มี opsonized zymosan) x 1000

4. **ค่าความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือด** (clearance of bacteria) **(ดัดแปลงจาก** Martin *et al.*, 1993)

วิธีการ

1. เตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรียสำหรับฉีดเข้ากุ้งทดลอง โดยใช้เชื้อ *V. harveyi* บริสุทธิ์ ที่เลี้ยงในอาหาร TSA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่เป็นกลุ่มเดี่ยวมาละลายในน้ำเกลือปลอดเชื้อ จากนั้นนำไปวัดค่าความทึบแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm ให้ได้ค่าความทึบแสง ประมาณ 0.100-0.150 นำสารละลายเชื้อนี้มานับปริมาณเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA) ผสมกับเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์และอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS ผสมกับเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธีการ drop plating หยดละ 20 µl โดยเจือจางความเข้มข้นของเชื้อตั้งแต่ 10^{-1}-10^{-6} บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง

2. นำสารละลายเชื้อที่เตรียมไว้ฉีดเข้าสู่ตัวกุ้งทดลองในปริมาณ 0.1 ml ต่อกุ้ง 1 ตัว จากนั้น 3 ชั่วโมงดูดเลือดจากกุ้งที่ถูกฉีดโดยดูดเลือดกุ้งในปริมาตร 0.5 ml นำเลือดกุ้งมานับปริมาณเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ผสมกับเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ และอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS ผสมกับเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธีการ drop plating หยดละ 20 µl

โดยเจือจางความเข้มข้นของเชื้อตั้งแต่ 1/2, 1/4 และ 1/8 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เจริญในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ นำมาคำนวณปริมาณ cfu/ml ของเลือดเพื่อดูความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือดกุ้ง

5. การทดสอบความต้านทานเชื้อแบคทีเรีย

1. เตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรียสำหรับฉีดเข้ากุ้งทดลอง โดยใช้เชื้อ *V. harveyi* บริสุทธิ์ ที่เลี้ยงในอาหาร TSA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่เป็นกลุ่มเดี่ยวมาละลายในน้ำเกลือปลอดเชื้อ จากนั้นนำไปวัดค่าความทึบแสงที่ความยาวคลื่น 610 nm ให้ได้ค่าความทึบแสง ประมาณ 0.093 ซึ่งคือค่า LD_{50} ของเชื้อชนิดนี้ จากนั้นนำไปฉีดเข้าสู่ตัวกุ้งที่บริเวณกล้ามเนื้อท้องปล้องสุดท้ายโดยฉีดตัวละ 0.1 ml

2. บันทึกอัตราการตายและนำมาคำนวณค่า RPS ของวัคซีน จากสูตร

$$RPS = 1 - \frac{\text{อัตราการตายของกลุ่มที่ได้รับวัคซีน}}{\text{อัตราการตายของกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน}} \times 100$$

ภาคผนวก ค ตารางผลการทดลอง

ตารางภาคผนวกที่ ค1 การวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหา LD_{50} ที่ 14 วัน ตามวิธีของ Reed และ Muench (1938)

conc.	lny D	n	nDd	nAl	acc Dd	acc Al	t	Per M
5.06×10^{10}	24.648	10	10	0	39	11	50	100
5.72×10^{8}	20.165	10	10	0	29	11	40	100
2.21×10^{8}	19.214	10	8	2	19	11	30	80
1.28×10^{8}	18.671	10	7	3	11	9	20	70
6.33×10^{7}	17.964	10	4	6	4	6	10	40

conc. = concentration of *V. harveyi* (cell/ml/shrimp)

lny D = lny dose

n = number of test shrimp per concentration

n Dd = number of dead shrimp

n Al = number of living shrimp

acc Dd = accumulated of dead shrimp

acc Al = accumulated of living shrimp

t = total of accumulated dead and living shrimp

Per M = cumulative percentage mortality

การคำนวณค่า LD_{50} ที่ 14 วัน

จากสูตร

LD_{50} = lny concentration below 50%mortality + (50- mortality below 50%/ mortality above 50% - mortality below 50%) (lny concentration above 50% - lny concentration below 50%)

$$= 17.886 + \frac{(50-40)\ (18.660-17.886)}{(70-40)}$$

$$= 17.886+0.258$$

$$= 18.144$$

get anti lyn $18.144 = 7.58 \times 10^{7}$

การคำนวณหาค่า absorbance

จากสูตร

$$lny = 29.786x + 15.384$$

เมื่อ y = จำนวณเซลล์ต่อมิลลิลิตร

x = absorbance ที่ 610 นาโนเมตร

R^2 = ค่าสหสัมพันธ์ (corelation) = 0.88

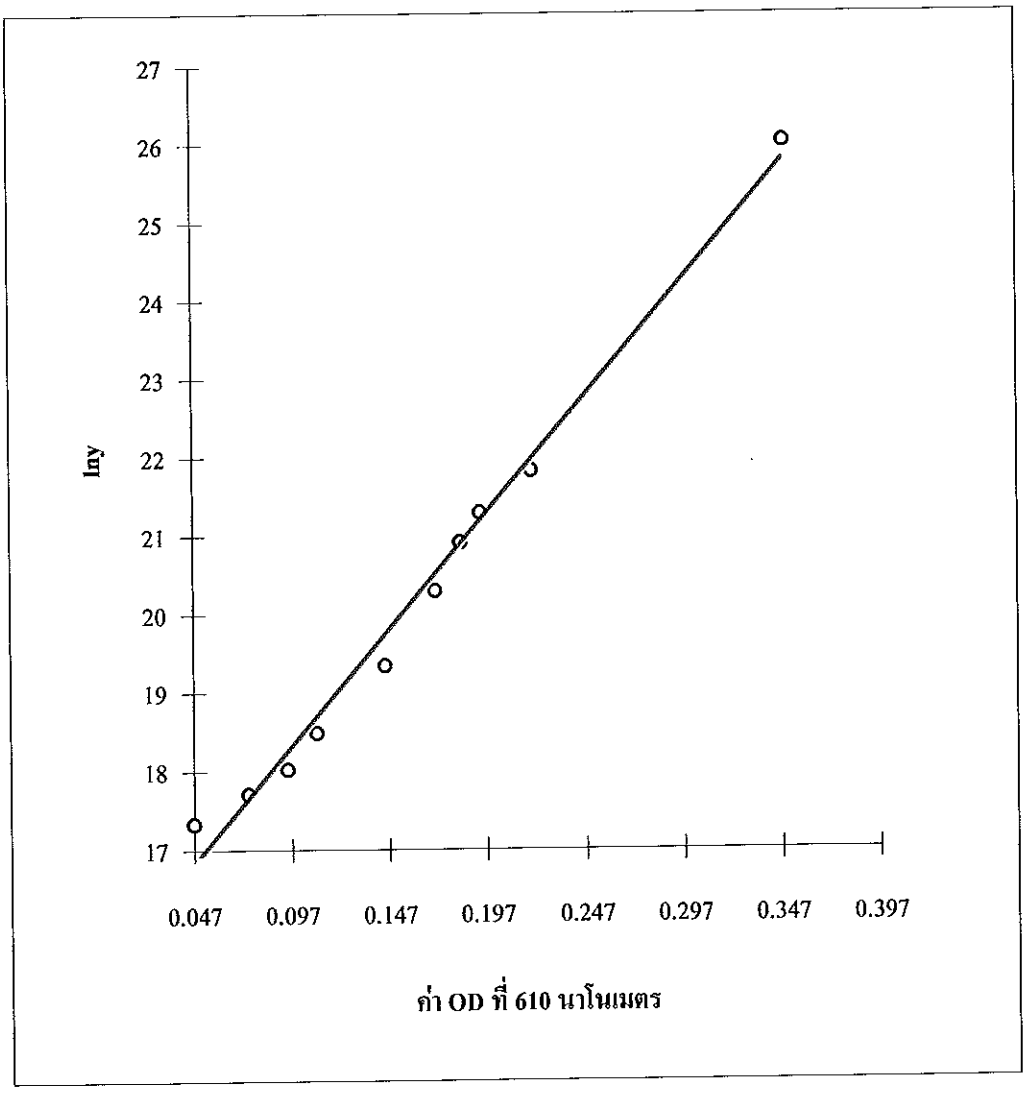
แทนค่าในสูตร

$18.144 = 29.786x + 15.384$

$x = 0.0926$

ดังนั้นค่า absorbance ที่ 610 นาโนเมตร คือ 0.093

ภาพผนวกที่ ค1 standard curve ระหว่างค่า absorbance และ จำนวน cell/ml (lny)



lny = 29.786x + 15.384

เมื่อ y = จำนวน cell/ml

x = absorbance ที่ 610 นาโนเมตร

R = ค่าสหสัมพันธ์ (corelation) มีค่า = 0.9897

ตารางภาคผนวกที่ ค2 การหา standard curve ระหว่างค่า absorbance และ จำนวน cell/ml (lny)

absorbance	lny
0.047	17.327
0.075	17.707
0.095	18.020
0.110	18.484
0.145	19.337
0.171	20.292
0.184	20.906
0.194	21.287
0.220	21.822
0.349	26.022

ตารางภาคผนวกที่ ค3 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0%ภายหลังจากได้รับอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 10 วัน

NO.	µg protein	mg protein/sample(200µl)	unit/min	unit/min/mg protein
1	98.92	0.198	50.5	255.051
2	67.06	0.134	35	261.194
3	43.17	0.086	25	290.698
4	37.49	0.075	14.5	193.333
5	79.58	0.159	34	213.836
6	39.0	0.078	20	256.410
7	64.79	0.130	18.5	142.31
8	27.25	0.055	13	236.364
9	26.87	0.054	6	111.111
10	43.55	0.087	20	229.885

$\bar{x}$ = 219.019 ± 56.022

ตารางภาคผนวกที่ ค4 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0.1%ภายหลังจากได้รับอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 10 วัน

NO.	µg protein	mg protein/sample(200µl)	unit/min	unit/min/mg protein
1	43.55	0.087	14	160.92
2	47.35	0.095	18.5	194.737
3	30.66	0.061	14	229.508
4	43.17	0.086	18	209.302
5	17.01	0.034	9	264.706
6	32.18	0.064	12	187.500
7	59.48	0.119	26	218.487
8	31.80	0.064	12	187.500
9	35.21	0.070	19	271.428
10	61.38	0.123	24	195.122

$\bar{x}$ = 211.921 ± 35.052

ตารางภาคผนวกที่ ค5 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0.5%ภายหลังจากได้รับอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 10 วัน

NO.	µg protein	mg protein/sample(200µl)	unit/min	unit/min/mg protein
1	19.82	0.010	9.5	237.500
2	112.08	0.224	57	254.464
3	56.73	0.113	28	247.787
4	67.49	0.135	25	185.185
5	68.64	0.137	39.5	288.321
6	41.35	0.083	14	168.674
7	30.97	0.062	10	161.290
8	61.34	0.123	33.5	272.357
9	51.35	0.103	27	262.136
10	42.50	0.085	15	176.471

$\bar{x}$ = 225.418 ± 47.54

ตารางภาคผนวกที่ ค6 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 1%ภายหลังจากได้รับอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 10 วัน

NO.	µg protein	mg protein/sample(200µl)	unit/min	unit/min/mg protein
1	31.36	0.063	12	190.476
2	29.82	0.060	15	250.000
3	29.43	0.059	11	186.441
4	62.88	0.126	37	293.650
5	60.57	0.121	35	289.256
6	31.36	0.063	8	126.984
7	39.04	0.078	20.5	262.820
8	29.82	0.060	10	166.667
9	24.05	0.048	7	145.833
10	36.74	0.073	18	246.575

$\bar{x}$ = 215.87 ± 60.08

ตารางภาคผนวกที่ ค7 ปริมาณ SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0% หลังจากได้รับอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 10 วัน

ตัวที่	ค่าเฉลี่ย OD.ของกลุ่มใส่ zymosan	ค่าเฉลี่ย OD.ของกลุ่มไม่ใส่ zymosan	SO anion
1	256.5	247	9.5
2	205	193.5	11.5
3	195	180	15
4	237.5	226.5	11
5	220.5	199	16.5
6	247	235	12
7	196	186	10
8	203.5	190.5	13
9	209.5	196	13.5
10	209.5	199.5	10

$\bar{x} = 12.2 \pm 2.29$, blank = 0.084

ตารางภาคผนวกที่ ค8 ปริมาณ SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0.1%หลังจากได้รับอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 10 วัน

ตัวที่	ค่าเฉลี่ย OD.ของกลุ่มใส่ zymosan	ค่าเฉลี่ย OD.ของกลุ่มไม่ใส่ zymosan	SO anion
1	255	238.5	16.5
2	249	231.5	17.5
3	235.5	208.5	27
4	217.5	188.0	29.5
5	262.5	239	23.5
6	278	259	19
7	249	219.5	29.5
8	218.5	209.0	9.5
9	307.5	192.0	53
10	243	200.5	42.5

$\bar{x} = 26.75 \pm 12.75$, blank = 0.084

ตารางภาคผนวกที่ ค9 ปริมาณ SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0.5%หลังได้รับอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 10 วัน

ตัวที่	ค่าเฉลี่ย OD.ของกลุ่มใส่ zymosan	ค่าเฉลี่ย OD.ของกลุ่มไม่ใส่ zymosan	SO anion
1	195.5	131.5	64
2	200.5	141.5	59
3	145.5	124.5	21
4	168	126	42
5	183.5	151.5	32
6	164.5	139	25.5
7	187.5	130.5	57
8	157.5	126	31.5
9	191	156.5	34.5
10	161	121.5	39.5

$\bar{x} = 40.6 \pm 14.77$, blank = 0.084

ตารางภาคผนวกที่ ค10 ปริมาณ SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 1%หลังจากได้รับอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 10 วัน

ตัวที่	ค่าเฉลี่ย OD.ของกลุ่มใส่ zymosan	ค่าเฉลี่ย OD.ของกลุ่มไม่ใส่ zymosan	SO anion
1	139	115	24
2	227.5	146	81.5
3	174	107.5	66.5
4	148.5	113	35.5
5	143	123	20
6	159	119	40
7	188.5	128	60.5
8	179.5	127	52.5
9	214.5	140	74.5
10	189	114	75

$\bar{x} = 53 \pm 22.11$, blank = 0.084

ตารางภาคผนวกที่ ค11 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0%หลังจากกินอาหารผสมวัคซีน10 วัน (จำนวนเชื้อเริ่มต้นที่ฉีดคือ 1.2×10^6 CFU/ml)

NO.	CFU/20 µl	CFU/ml
1	9	450
2	10	100
3	15	450
4	4	200
5	4	200
6	7	350
7	4	200
8	16	800
9	16	800
10	8	400

$\bar{X} = 3.95 \times 10^2 \pm 2.44 \times 10^2$

ตารางภาคผนวกที่ ค12 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0.1%หลังจากกินอาหารผสมวัคซีน10วัน

NO.	CFU/20 µl	CFU/ml
1	4	200
2	4	200
3	3.5	175
4	2	100
5	4	200
6	6	300
7	2.5	125
8	5	250
9	3	150
10	7	350

$\bar{X} = 2.05 \times 10^2 \pm 0.771 \times 10^2$

ตารางภาคผนวกที่ ค13 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0.5%หลังจากกินอาหารผสมวัคซีน10วัน

NO.	CFU/20µl	CFU/ml
1	6	300
2	12	600
3	5	250
4	2	100
5	4	200
6	4	200
7	2	100
8	5	250
9	8	400
10	6	300

$\overline{X} = 2.70 \times 10^{2} \pm 1.475 \times 10^{2}$

ตารางภาคผนวกที่ ค14 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 1%หลังจากกินอาหารผสมวัคซีน10วัน

NO.	CFU/20µl	CFU/ml
1	5	250
2	7	350
3	3	150
4	12	600
5	3	150
6	6	300
7	8	400
8	4	200
9	10	100
10	8	400

$\overline{X} = 2.90 \times 10^{2} \pm 1.52 \times 10^{2}$

ตารางภาคผนวกที่ ค15 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBSของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0%หลังจากกินอาหารผสมวัคซีน10วัน

NO.	CFU/20µl	CFU/ml
1	4	200
2	2	100
3	9	450
4	2	100
5	2.5	125
6	4	200
7	2	100
8	4	200
9	7	350
10	5	250

$\bar{X} = 2.075 \times 10^{2} \pm 1.17 \times 10^{2}$

ตารางภาคผนวกที่ ค16 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBSของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0.1%หลังจากกินอาหารผสมวัคซีน10วัน

NO.	CFU/20µl	CFU/ml
1	2	100
2	3	150
3	2	100
4	1	50
5	0	0
6	0	0
7	1	50
8	0	0
9	1	50
10	1	50

$\bar{X} = 0.55 \times 10^{2} \pm 0.47 \times 10^{2}$

ตารางภาคผนวกที่ ค17 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBSของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0.5%หลังจากกินอาหารผสมวัคซีน10วัน

NO.	CFU/20µl	CFU/ml
1	0	0
2	2	100
3	0	0
4	2	100
5	1	50
6	1	50
7	1	50
8	2	100
9	3	150
10	1	50

$\overline{X}= 0.60x10^{2} \pm 0.46x10^{2}$

ตารางภาคผนวกที่ ค18 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBSของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0.1%หลังจากกินอาหารผสมวัคซีน10วัน

NO.	CFU/20µl	CFU/ml
1	1	50
2	5	250
3	2	100
4	2	100
5	1	50
6	2	100
7	1	50
8	1	50
9	2	100
10	1	50

$\overline{X}= 0.90x10^{2} \pm 0.61x10^{2}$

ตารางภาคผนวกที่ ค19 จำนวนกุ้งที่ตายภายหลังจากฉีดเชื้อ *V. harveyi* ภายหลังจากกินอาหารผสมวัคซีน 0, 0.1, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักอาหาร เป็นเวลา 10 วัน

ตัวที่	อาหารผสมวัคซีน 0% (ชุดที่ 1)	อาหารผสมวัคซีน 0.1% (ชุดที่ 2)	อาหารผสมวัคซีน 0.5% (ชุดที่ 3)	อาหารผสมวัคซีน 1% (ชุดที่ 4)
1	4	2	3	1
2	1	1	0	2
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
6	0	0	0	0
7	0	0	0	0
8	0	0	0	0
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0

ค่าประสิทธิภาพของวัคซีน (RPS)

$$RPS = 1 - \frac{\text{อัตราการตายของกลุ่มที่ได้รับวัคซีน}}{\text{อัตราการตายของกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน}} \times 100$$

ดังนั้นค่า RPS ของวัคซีนชุดที่ 2= $1 - \frac{0.3}{0.5} \times 100 = 40\ \%$

ดังนั้นค่า RPS ของวัคซีนชุดที่ 3= $1 - \frac{0.3}{0.5} \times 100 = 40\ \%$

ดังนั้นค่า RPS ของวัคซีนชุดที่ 4= $1 - \frac{0.3}{0.5} \times 100 = 40\ \%$

ตารางภาคผนวกที่ ค20 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0%ภายหลังจากได้รับอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 20 วัน

NO.	µg protein	mg protein/sample(200µl)	unit/min	unit/min/mg protein
1	59.325	0.118	18	152.542
2	52.47	0.105	23	219.047
3	81.78	0.164	34.5	210.365
4	97.00	0.194	28	144.329
5	29.25	0.059	10.5	177.966
6	52.09	0.104	21	201.923
7	99.29	0.199	33	165.829
8	64.27	0.129	27	209.302
9	72.64	0.145	44.5	306.896
10	48.82	0.084	17	202.380

$\bar{x}$ = 199.058 ± 45.93

ตารางภาคผนวกที่ ค21 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0.1%หลังจากได้รับอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 20 วัน

NO.	µg protein	mg protein/sample(200µl)	unit/min	unit/min/mg protein
1	76.07	0.152	32	210.526
2	56.28	0.113	22.5	199.115
3	66.93	0.134	31.5	235.074
4	90.15	0.180	49.5	275.000
5	98.532	0.197	33.5	170.050
6	48.28	0.096	23	239.583
7	47.52	0.095	18	189.473
8	69.22	0.138	27	195.652
9	79.12	0.158	61	386.075
10	65.79	0.132	33	250.000

$\bar{x}$ = 235.05 ± 61.820

ตารางภาคผนวกที่ ค22 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0.5%หลังจากได้รับอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 20 วัน

NO.	µg protein	mg protein/sample(200µl)	unit/min	unit/min/mg protein
1	41.67	0.083	19.5	231.939
2	35.94	0.071	10	140.845
3	67.13	0.134	28	208.955
4	94.51	0.189	55	291.005
5	27.02	0.054	6	111.111
6	36.89	0.073	9	123.280
7	25.12	0.050	8	160.000
8	43.26	0.086	22	255.813
9	47.40	0.094	27	287.234
10	119.02	0.238	72	302.521

$\bar{x}$ = 211.570 ± 73.307

ตารางภาคผนวกที่ ค23 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 1%หลังจากได้รับอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 20 วัน

NO.	µg protein	mg protein/sample(200µl)	unit/min	unit/min/mg protein
1	29.57	0.059	9	152.542
2	35.62	0.071	14	197.183
3	13.34	0.026	7	269230
4	21.29	0.042	8	190.476
5	15.25	0.030	8	266.66
6	23.52	0.047	9	191.48
7	30.21	0.060	10.5	175.000
8	23.84	0.047	12	255.319
9	17.795	0.035	4	114.285
10	24.79	0.049	12	244.890

$\bar{x}$ = 205.706 ± 52.048

ตารางภาคผนวกที่ ค24 ปริมาณ SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0% หลังจากได้รับอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 20 วัน

ตัวที่	ค่าเฉลี่ย OD.ของกลุ่มใส่ zymosan	ค่าเฉลี่ย OD.ของกลุ่มไม่ใส่ zymosan	SO anion
1	184	164.5	19.5
2	155	139	16
3	170.5	156	14.5
4	162.5	147	15.5
5	132.5	127	5.5
6	164.5	147	17.5
7	156.5	139.5	17
8	155	146.5	8.5
9	180	165	15
10	146.5	139.5	7

$\bar{x} = 13.6 \pm 4.8$, blank = 0.084

ตารางภาคผนวกที่ ค25 ปริมาณ SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0.1%หลังจากได้รับอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 20 วัน

ตัวที่	ค่าเฉลี่ย OD.ของกลุ่มใส่ zymosan	ค่าเฉลี่ย OD.ของกลุ่มไม่ใส่ zymosan	SO anion
1	156.5	127	29.5
2	185.5	147.5	44
3	172.5	156	16.5
4	158.5	127.5	31
5	147	123.5	23.5
6	145	118.5	26.5
7	138	117.5	20.5
8	159.5	131.5	28
9	132.5	123.5	14
10	164	127.5	36.5

$\bar{x} = 27.0 \pm 9.04$, blank = 0.084

ตารางภาคผนวกที่ ค26 ปริมาณ SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0.5%หลังจากได้รับอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 20

ตัวที่	ค่าเฉลี่ย OD.ของกลุ่มใส่ zymosan	ค่าเฉลี่ย OD.ของกลุ่มไม่ใส่ zymosan	SO anion
1	178.5	132.5	46
2	182.5	134.5	48
3	176	134.0	42
4	165.5	129.5	36
5	195	132.5	62.5
6	208	177.5	30.5
7	219	183.0	36
8	177	130.5	46.5
9	158.5	132.5	26
10	144.5	121.0	23.5

$\bar{x} = 39.7 \pm 11.74$, blank = 0.084

ตารางภาคผนวกที่ ค27 ปริมาณ SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 1%หลังจากได้รับอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 20 วัน

ตัวที่	ค่าเฉลี่ย OD.ของกลุ่มใส่ zymosan	ค่าเฉลี่ย OD.ของกลุ่มไม่ใส่ zymosan	SO anion
1	243	209.0	34
2	239	162.5	76.5
3	201.5	154.5	47
4	237	179.5	57.5
5	193	153.5	39.5
6	213.5	157.5	56
7	279.5	202.5	95
8	193.0	153.5	39.5
9	214.0	158.0	56
10	228.5	183.0	45.5

$\bar{x} = 54.65 \pm 18.69$, blank = 0.084

ตารางภาคผนวกที่ ค28 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0%หลังจากกินอาหารผสมวัคซีน 20 วัน วัน (จำนวนเชื้อเริ่มต้นที่ฉีดคือ 1.6×10^{6} CFU/ml)

NO.	CFU/20 µl	CFU/ml
1	15	750
2	5	250
3	13	650
4	16	800
5	10	500
6	13	650
7	4	200
8	11	550
9	14	700
10	7	350

$\overline{X} = 3.915 \times 10^{2} \pm 2.87 \times 10^{2}$

ตารางภาคผนวกที่ ค29 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0.1%หลังจากกินอาหารผสมวัคซีน20วัน

NO.	CFU/20 µl	CFU/ml
1	8	200
2	7	250
3	5	0
4	6	0
5	7	75
6	3	50
7	2	0
8	7	225
9	4	175
10	3	75

$\overline{X} = 2.60 \times 10^{2} \pm 0.10 \times 10^{2}$

ตารางภาคผนวกที่ ค30 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0.5%หลังจากกินอาหารผสมวัคซีน20วัน

NO.	CFU/20µl	CFU/ml
1	5	250
2	5	250
3	4	200
4	3.5	175
5	7.5	325
6	6	300
7	2	100
8	4	200
9	4.5	225
10	3	150

$\bar{X} = 2.175 \times 10^{2} \pm 0.677 \times 10^{2}$

ตารางภาคผนวกที่ ค31 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 1% หลังจากกินอาหารผสมวัคซีน20วัน

NO.	CFU/20µl	CFU/ml
1	4	200
2	7	350
3	3.5	175
4	5	250
5	2	100
6	3	150
7	4	200
8	2	100
9	3	150
10	5	250

$\bar{X} = 1.925 \times 10^{2} \pm 0.76 \times 10^{2}$

ตารางภาคผนวกที่ ค32 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBSของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0%หลังจากกินอาหารผสมวัคซีน20วัน

NO.	CFU/20µl	CFU/ml
1	4	200
2	1	50
3	8	400
4	7	350
5	2	100
6	10	500
7	2	100
8	8	400
9	2	100
10	7	350

$\bar{X} = 2.55 \times 10^{2} \pm 1.62 \times 10^{2}$

ตารางภาคผนวกที่ ค33 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBSของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0.1%หลังจากกินอาหารผสมวัคซีน20วัน

NO.	CFU/20µl	CFU/ml
1	4	200
2	5	250
3	0	0
4	0	0
5	1.5	75
6	1	50
7	0	0
8	4.5	225
9	3.5	175
10	1.5	75

$\bar{X} = 1.05 \times 10^{2} \pm 0.98 \times 10^{2}$

ตารางภาคผนวกที่ ค34 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBSของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0.5%หลังจากกินอาหารผสมวัคซีน20วัน

NO.	CFU/20 µl	CFU/ml
1	0	0
2	3.5	175
3	3	150
4	0	0
5	2.5	125
6	2	100
7	0	0
8	0	0
9	2.5	125
10	3	150

$\bar{X}= 0.825x10^{2} \pm 0.73x10^{2}$

ตารางภาคผนวกที่ ค35 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBSของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 1%หลังจากกินอาหารผสมวัคซีน20วัน

NO.	CFU/20 µl	CFU/ml
1	2	100
2	3.5	175
3	1	50
4	2.5	125
5	0	0
6	2	100
7	3	150
8	0	0
9	0	0
10	3	150

$\bar{X}= 0.85x10^{2} \pm 0.68x10^{2}$

ตารางภาคผนวกที่ ค36 จำนวนกุ้งที่ตายภายหลังจากฉีดเชื้อ *V. harveyi* ภายหลังจากกิน อาหารผสมวัคซีน 0, 0.1, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักอาหาร เป็นเวลา 20 วัน

ตัวที่	อาหารผสมวัคซีน 0% (ชุดที่ 1)	อาหารผสมวัคซีน 0.1% (ชุดที่ 2)	อาหารผสมวัคซีน 0.5% (ชุดที่ 3)	อาหารผสมวัคซีน 1% (ชุดที่ 4)
1	3	2	1	1
2	1	2	3	2
3	2	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
6	0	0	0	0
7	0	0	0	0
8	0	0	0	0
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0

<u>ค่าประสิทธิภาพของวัคซีน (RPS)</u>

$$RPS = 1 - \frac{\text{อัตราการตายของกลุ่มที่ได้รับวัคซีน}}{\text{อัตราการตายของกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน}} \times 100$$

ดังนั้นค่า RPS ของวัคซีนชุดที่ 2 $= 1 - \frac{0.4}{0.6} \times 100 = 33.33\%$

ดังนั้นค่า RPS ของวัคซีนชุดที่ 3 $= 1 - \frac{0.3}{0.6} \times 100 = 50\ \%$

ดังนั้นค่า RPS ของวัคซีนชุดที่ 4 $= 1 - \frac{0.3}{0.6} \times 100 = 50\ \%$

ตารางภาคผนวกที่ ค37 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0% ภายหลังจากได้รับอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 30 วัน

NO.	µg protein	mg protein/sample(200µl)	unit/min	unit/min/mg protein
1	50.99	0.102	18	176.470
2	110.58	0.221	45.5	205.882
3	46.43	0.093	18	193.548
4	132.66	0.265	52.5	198.113
5	64.66	0.129	19.5	151.113
6	110.58	0.223	43	192.825
7	126.35	0.252	46.5	184.523
8	43.982	0.088	17	193.181
9	60.10	0.120	21	175.000
10	59.756	0.119	17	142.857

$\bar{x}$ = 165.456 ± 55.854

ตารางภาคผนวกที่ ค38 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0.1%ภายหลังจากได้รับอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 30 วัน

NO.	µg protein	mg protein/sample(200µl)	unit/min	unit/min/mg protein
1	54.498	0.109	15.5	142.202
2	58.354	0.116	22	189.655
3	53.79	0.107	17	158.878
4	51.34	0.102	20.5	200.980
5	68.86	0.137	30	218.978
6	69.22	0.138	26	188.405
7	52.04	0.104	19.5	187.500
8	53.44	0.107	16.5	154.205
9	67.818	0.135	21	155.550
10	57.302	0.114	17	149.122

$\bar{x}$ = 174.518 ± 25.746

ตารางภาคผนวกที่ ค39 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0.5%ภายหลังจากได้รับอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 30 วัน

NO.	µg protein	mg protein/sample(200µl)	unit/min	unit/min/mg protein
1	60.531	0.121	21	173.553
2	65.446	0.130	23.5	180.770
3	27.532	0.055	12	218.181
4	52.457	0.105	19	180.952
5	80.190	0.160	26	162.500
6	42.276	0.084	15	178.570
7	61.584	0.121	19	157.024
8	45.787	0.091	15	164.835
9	49.297	0.098	18	183.673
10	80.190	0.160	34.5	215.625

$\bar{x}$ = 181.568 ± 20.616

ตารางภาคผนวกที่ ค40 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 1%ภายหลังจากได้รับอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 30 วัน

NO.	µg protein	mg protein/sample(200µl)	unit/min	unit/min/mg protein
1	46.84	0.093	20	215.053
2	47.54	0.095	15	157.894
3	37.36	0.074	13.5	182.432
4	55.61	0.111	23.5	211.711
5	72.12	0.144	24.5	170.138
6	53.16	0.106	21	198.113
7	31.04	0.062	9	145.161
8	46.49	0.093	13	139.785
9	47.542	0.095	23	242.105
10	44.383	0.088	14	159.090

$\bar{x}$ = 182.148 ± 33.72

ตารางภาคผนวกที่ ค41 ปริมาณ SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0%หลังจากได้รับอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 30 วัน

ตัวที่	ค่าเฉลี่ย OD.ของกลุ่มใส่ zymosan	ค่าเฉลี่ย OD.ของกลุ่มไม่ใส่ zymosan	SO anion
1	200	167	33
2	182	150.5	31.5
3	153.5	125.5	28
4	149	123	26
5	155	133.5	21.5
6	149.5	133	16.5
7	159	132.5	26.5
8	143.5	127.5	16
9	155.5	134.5	21
10	141.5	129.5	12

$\bar{x} = 23.2 \pm 6.965$, blank = 0.084

ตารางภาคผนวกที่ ค42 ปริมาณ SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0.1%หลังจากได้รับอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 30 วัน

ตัวที่	ค่าเฉลี่ย OD.ของกลุ่มใส่ zymosan	ค่าเฉลี่ย OD.ของกลุ่มไม่ใส่ zymosan	SO anion
1	167.5	139	28.5
2	189.5	159	30.5
3	186.5	145	41.5
4	166	135	31
5	199	168	31
6	212	164.5	47.5
7	203	177	26
8	200	168	32
9	281	202	79
10	200	162	38

$\bar{x} = 38.5 \pm 15.654$, blank = 0.084

ตารางภาคผนวกที่ ค43 ปริมาณ SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0.5%หลังจากได้รับอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 30 วัน

ตัวที่	ค่าเฉลี่ย OD.ของกลุ่มใส่ zymosan	ค่าเฉลี่ย OD.ของกลุ่มไม่ใส่ zymosan	SO anion
1	215.5	152	63.5
2	224.5	166.5	58
3	173	115.5	57.5
4	197	143.5	53.5
5	179	137.5	41.5
6	188	121.5	66.5
7	198	129	69
8	184.5	145	39.5
9	182.5	128	54.5
10	174	128	46

$\bar{x} = 54.95 \pm 10.12$, blank = 0.084

ตารางภาคผนวกที่ ค44 ปริมาณ SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 1%หลังจากได้รับอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 30 วัน

ตัวที่	ค่าเฉลี่ย OD.ของกลุ่มใส่ zymosan	ค่าเฉลี่ย OD.ของกลุ่มไม่ใส่ zymosan	SO anion
1	293	161	132
2	222.5	158	64.5
3	214.5	147.5	67
4	231.5	160.5	71
5	214.5	160.5	54
6	293.5	193.5	100
7	164.5	121.5	43
8	285	169.5	115.5
9	302.5	185.5	117
10	203	140	63

$\bar{x} = 82.7 \pm 30.704$, blank = 0.084

ตารางภาคผนวกที่ ค45 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกิน โดยผสมวัคซีนในอาหาร 0%หลังจากกินอาหารผสมวัคซีน30วัน (จำนวนเชื้อเริ่มต้นที่ฉีดคือ 1.97×10^6 CFU/ml)

NO.	CFU/20 µl	CFU/ml
1	6	300
2	10	500
3	15	750
4	12.5	625
5	15	750
6	9	450
7	7	350
8	5.5	275
9	16	800
10	12	600

$\bar{X} = 5.40 \times 10^2 \pm 1.94 \times 10^2$

ตารางภาคผนวกที่ ค46 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0.1%หลังจากกินอาหารผสมวัคซีน30วัน

NO.	CFU/20 µl	CFU/ml
1	10	500
2	4	200
3	7	350
4	4	200
5	3	150
6	9	450
7	5	250
8	5.5	275
9	5	250
10	8	400

$\bar{X} = 3.025 \times 10^2 \pm 1.17 \times 10^2$

ตารางภาคผนวกที่ ค47 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0.5%หลังจากกินอาหารผสมวัคซีน30วัน

NO.	CFU/20 µl	CFU/ml
1	10	500
2	6	300
3	7	350
4	12	600
5	12	600
6	9	450
7	5	200
8	8	400
9	7.5	375
10	6	300

$\bar{X} = 4.075 \times 10^{2} \pm 1.31 \times 10^{2}$

ตารางภาคผนวกที่ ค48 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 1%หลังจากกินอาหารผสมวัคซีน30วัน

NO.	CFU/20 µl	CFU/ml
1	10	500.
2	4	200
3	8	400
4	4	200
5	4.5	225
6	4	200
7	9	450
8	6.5	325
9	9.5	425
10	10	500

$\bar{X} = 3.425 \times 10^{2} \pm 1.275 \times 10^{2}$

ตารางภาคผนวกที่ ค49 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBSของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0%หลังจากกินอาหารผสมวัคซีน30วัน

NO.	CFU/20 µl	CFU/ml
1	5	250
2	9	450
3	8	400
4	6.5	325
5	3	150
6	6	300
7	5	250
8	4.5	225
9	8	400
10	10	500

$\bar{X}= 3.25x10^{2} \pm 1.10x10^{2}$

ตารางภาคผนวกที่ ค50 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBSของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0.1%หลังจากกินอาหารผสมวัคซีน30วัน

NO.	CFU/20 µl	CFU/ml
1	9	450
2	1	50
3	2	100
4	2	100
5	3	150
6	8	400
7	2.5	125
8	2	100
9	1	50
10	5	250

$\bar{X}= 1.775x10^{2} \pm 1.426x10^{2}$

ตารางภาคผนวกที่ ค51 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBSของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 0.5%หลังจากกินอาหารผสมวัคซีน30วัน

NO.	CFU/20 µl	CFU/ml
1	3.5	175
2	4.5	225
3	2	100
4	4	200
5	8	400
6	3.5	175
7	1	50
8	3	150
9	4	200
10	3	150

$\bar{X}= 1.825x10^{2} \pm 0.92x10^{2}$

ตารางภาคผนวกที่ ค52 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBSของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีกินโดยผสมวัคซีนในอาหาร 1%หลังจากกินอาหารผสมวัคซีน30วัน

NO.	CFU/20 µl	CFU/ml
1	2	100
2	1.5	75
3	2	100
4	4	200
5	4	200
6	2	100
7	4	200
8	5.5	275
9	4.5	225
10	5	250

$\bar{X}= 1.725x10^{2} \pm 0.721x10^{2}$

ตารางภาคผนวกที่ ค53 จำนวนกุ้งที่ตายภายหลังจากฉีดเชื้อ *V. harveyi* ภายหลังจากกิน อาหารผสมวัคซีน 0, 0.1, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักอาหาร เป็นเวลา 20 วัน

ตัวที่	อาหารผสมวัคซีน 0% (ชุดที่ 1)	อาหารผสมวัคซีน 0.1% (ชุดที่ 2)	อาหารผสมวัคซีน 0.5% (ชุดที่ 3)	อาหารผสมวัคซีน 1% (ชุดที่ 4)
1	4	2	3	2
2	1	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
6	0	0	0	0
7	0	0	0	0
8	0	0	0	0
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0

ค่าประสิทธิภาพของวัคซีน (RPS)

$$RPS = 1 - \frac{\text{อัตราการตายของกลุ่มที่ได้รับวัคซีน}}{\text{อัตราการตายของกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน}} \times 100$$

ดังนั้นค่า RPS ของวัคซีนชุดที่ 2 $= 1 - \frac{0.2}{0.5} \times 100 = 60\ \%$

ดังนั้นค่า RPS ของวัคซีนชุดที่ 3 $= 1 - \frac{0.3}{0.5} \times 100 = 40\ \%$

ดังนั้นค่า RPS ของวัคซีนชุดที่ 4 $= 1 - \frac{0.2}{0.5} \times 100 = 60\ \%$

ตารางภาคผนวกที่ ค54 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการแช่ภายหลังจากได้รับวัคซีนเป็นเวลา 10 วันโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 2.5 %

NO.	µg protein	mg protein/sample(200µl)	unit/min	unit/min/mg protein
1	58.93	0.1178	70	594.23
2	15.66	0.0313	8	255.59
3	53.94	0.1078	25.5	236.55
4	17.99	0.0359	30	835.65
5	35.96	0.0719	29.5	410.29
6	33.97	0.0679	36.5	537.55
7	37.63	0.0752	27.5	365.70
8	46.61	0.0932	43.5	466.74
9	15.33	0.0306	7	228.76
10	11.66	0.0233	13	557.94

$\bar{x}$ = 448.9 ± 191.51

ตารางภาคผนวกที่ ค55 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ไม่ได้รับวัคซีน(กลุ่มควบคุม)หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน

NO.	µg protein	mg protein/sample(200µl)	unit/min	unit/min/mg protein
1	4.34	0.0080	3	375
2	9.33	0.01866	14	752.68
3	93.55	0.1871	69.5	371.46
4	20.98	0.0419	11	262.53
5	11.00	0.022	8	363.64
6	21.98	0.0439	25.5	580.86
7	10.67	0.0213	20	938.97
8	5.67	0.0113	3	265.48
9	25.64	0.0512	10.5	205.48
10	19.32	0.0386	9	233.16

$\bar{x}$ = 434.88 ± 245.17

ตารางภาคผนวกที่ ค56 ค่า SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการแช่ภายหลังจากได้รับวัคซีนเป็นเวลา 10 วันโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 2.5 %

ตัวที่	ค่าเฉลี่ย OD.ของทรีตเม้นต์ - blank	ค่าเฉลี่ย OD.ของกลุ่ม control - blank	OD.ทรีตเม้นท์ - control
1	0.0635	0.003	0.0605
2	0.0515	0.0065	0.045
3	0.113	0.0895	0.0235
4	0.09	0.031	0.059
5	0.0805	0.02	0.0605
6	0.075	0.019	0.056
7	0.1135	0.0585	0.055
8	0.0825	0.033	0.0495
9	0.0475	0.031	0.0165

$\bar{x} = 0.0472 \pm 0.016$ * blank = 0.078

ตารางภาคผนวกที่ ค57 ค่า SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ไม่ได้รับวัคซีน(กลุ่มควบคุม)หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน

ตัวที่	ค่าเฉลี่ย OD.ของทรีตเม้นต์ - blank	ค่าเฉลี่ย OD.ของกลุ่ม control - blank	OD.ทรีตเม้นท์ - control
1	0.0825	0.057	0.0255
2	0.1045	0.0415	0.0595
3	0.1055	0.1015	0.004
4	0.061	0.016	0.045
5	0.0595	0.0205	0.039
6	0.1225	0.065	0.0575
7	0.06	0.036	0.024
8	0.0405	0.016	0.0245
9	0.0895	0.0265	0.063

$\bar{x} = 0.037 \pm 0.019$ * blank = 0.078

ตารางภาคผนวกที่ ค58 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีแช่โดยใช้วัคซีนเข้มข้น 2.5%ภายหลังจากแช่อาหารผสมวัคซีน 10 วัน (จำนวนเชื้อเรืองแสงเริ่มต้นที่ฉีดคือ 3.5×10^5 CFU/ml)

NO.	CFU/20 µl	CFU/ml
1	7	350
2	29	1450
3	296	14800
4	100	5000
5	1	50
6	19	950
7	44	2200
8	5	250
9	28	1400

$\bar{X} = 2.93 \times 10^3 \pm 4.69 \times 10^3$

ตารางภาคผนวกที่ ค59 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งทดลองกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน(กลุ่มควบคุม)ภายหลังจากแช่วัคซีนเป็นเวลา 10 วัน

NO.	CFU/20 µl	CFU/ml
1	20	100
2	28.5	1425
3	11	550
4	1	50
5	448	22400
6	4	200
7	5.5	275
8	28	1400
9	24	1200

$\bar{X} = 3.16 \times 10^3 \pm 7.23 \times 10^3$

ตารางภาคผนวกที่ ค60 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBSของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีแช่โดยใช้วัคซีนเข้มข้น 2.5%หลังจากกินอาหารผสมวัคซีน 10วัน

NO.	CFU/20 µl	CFU/ml
1	7	350
2	19	950
3	22	1100
4	32	1600
5	4.5	225
6	20	1000
7	17	850
8	1.5	75
9	17	850

$\bar{X} = 0.77x10^{3} \pm 0.48x10^{3}$

ตารางภาคผนวกที่ ค61 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBS ของกุ้งทดลองกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน(กลุ่มควบคุม)ภายหลังจากแช่วัคซีนเป็นเวลา 10 วัน

NO.	CFU/20 µl	CFU/ml
1	16.5	825
2	22	1100
3	7	350
4	0.5	25
5	76	3800
6	3	150
7	2.5	125
8	20	1000
9	56	2800

$\bar{X} = 1.13x10^{3} \pm 1.31x10^{3}$

ตารางภาคผนวกที่ ค62 จำนวนกุ้งที่ตายภายหลังจากฉีดเชื้อของกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่แช่วัคซีน หลังจากได้รับวัคซีนเป็นเวลา 10 วันโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 2.5 %

วันที่	กลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน	กลุ่มที่ได้รับวัคซีน
1	2	1
2	1	2
3	1	0
4	2	0
5	1	0
6	0	0
7	0	0
8	0	0
9	0	0
10	0	0
อัตราการตาย	0.7	0.3

ค่าประสิทธิภาพของวัคซีน (RPS)

$$RPS = 1 - \frac{\text{อัตราการตายของกลุ่มที่ได้รับวัคซีน}}{\text{อัตราการตายของกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน}} \times 100$$

ดังนั้นค่า $RPS = 1 - \frac{0.3}{0.7} \times 100 = 57.14\ \%$

ตารางภาคผนวกที่ ค63 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการแช่ภายหลังจากได้รับวัคซีนเป็นเวลา 20 วันโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 2.5 %

NO.	µg protein	mg protein/sample(200µl)	unit/min	unit/min/mg protein
1	39.04	0.0780	28	358.97
2	25.44	0.0508	15	295.27
3	52.63	0.1052	39.5	375.47
4	10.46	0.0216	8	370.37
5	16.84	0.0336	10	297.62
6	17.12	0.0342	12.5	365.49
7	30.16	0.0603	26.5	435.46
8	52.63	0.1052	39.5	375.47

$\bar{x}$ = 359.26 ± 45.33

ตารางภาคผนวกที่ ค64 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ไม่ได้รับวัคซีน(กลุ่มควบคุม)หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน

NO.	µg protein	mg protein/sample(200µl)	unit/min	unit/min/mg protein
1	52.63	0.1052	29.5	280.41
2	70.67	0.1413	23	162.77
3	37.09	0.0741	28	377.86
4	26.0	0.0520	6	115.38
5	2.14	0.0042	0.5	119.04
6	78.71	0.1574	28.5	181.06
7	40.15	0.0803	27.5	342.46
8	58.46	0.1169	30	256.63

$\bar{x}$ = 229.45± 100.08

ตารางภาคผนวกที่ ค65 ค่า SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการแช่ภายหลังจากได้รับวัคซีนเป็นเวลา 20 วันโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 2.5 %

ตัวที่	ค่าเฉลี่ย OD.ของทรีตเม้นต์ - blank	ค่าเฉลี่ย OD.ของกลุ่ม control - blank	OD.ทรีตเม้นท์ - control
1	0.0695	0.039	0.0305
2	0.121	0.055	0.066
3	0.175	0.042	0.133
4	0.10	0.035	0.065
5	0.071	0.0425	0.0285
6	0.119	0.0285	0.0905
7	0.102	0.021	0.081

$\bar{x} = 0.070 \pm 0.0361$ * blank = 0.078

ตารางภาคผนวกที่ ค66 ค่า SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ไม่ได้รับวัคซีน(กลุ่มควบคุม)หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน

ตัวที่	ค่าเฉลี่ย OD.ของทรีตเม้นต์ - blank	ค่าเฉลี่ย OD.ของกลุ่ม control - blank	OD.ทรีตเม้นท์ - control
1	0.081	0.059	0.022
2	0.089	0.080	0.009
3	0.049	0.0325	0.0165
4	0.072	0.048	0.024
5	0.1045	0.0715	0.033
6	0.125	0.067	0.058
7	0.0620	0.0365	0.0255
8	0.0625	0.0305	0.032

$\bar{x} = 0.0275 \pm 0.0145$ * blank = 0.078

ตารางภาคผนวกที่ ค67 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีแช่โดยใช้วัคซีนเข้มข้น 2.5%ภายหลังจากแช่อาหารผสมวัคซีน20วัน (จำนวนเชื้อเรืองแสงเริ่มต้นที่ฉีดคือ 6.5×10^4 CFU/ml)

NO.	CFU/20 µl	CFU/ml
1	190	9500
2	206	10300
3	55	2750
4	28.5	1425
5	34	1700
6	164	8200
7	22	1100
8	192	9560

$\bar{X} = 5.56 \times 10^3 \pm 4.15 \times 10^3$

ตารางภาคผนวกที่ ค68 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งทดลองกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน(กลุ่มควบคุม) ภายหลังจากแช่วัคซีนเป็นเวลา 20 วัน

NO.	CFU/20 µl	CFU/ml
1	49.5	2475
2	28.5	1425
3	1760	88000
4	22.5	11250
5	81	4500
6	4	200
7	25	1250
8	38	1900

$\bar{X} = 2.653 \times 10^3 \pm 2.73 \times 10^3$

ตารางภาคผนวกที่ ค69 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBSของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีแช่โดยใช้วัคซีนเข้มข้น 2.5%หลังจากกินอาหารผสมวัคซีน 20วัน

NO.	CFU/20 µl	CFU/ml
1	0	0 .
2	13	650
3	4.5	225
4	3.5	175
5	6.5	325
6	18	900
7	0	0
8	27	1350

$\overline{X}= 0.45x10^{3} \pm 0.47x10^{3}$

ตารางภาคผนวกที่ ค70 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBS ของกุ้งทดลองกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน(กลุ่มควบคุม)ภายหลังจากแช่วัคซีนเป็นเวลา 20 วัน

NO.	CFU/20 µl	CFU/ml
1	3	150
2	2	100
3	66	3300
4	1	50
5	9.5	475
6	5	250
7	9.5	475
8	46	2300

$\overline{X}= 0.816x10^{3} \pm 1.16x10^{3}$

ตารางภาคผนวกที่ ค71 จำนวนกุ้งที่ตายภายหลังจากฉีดเชื้อของกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่แช่วัคซีน หลังจากได้รับวัคซีนเป็นเวลา 20 วันโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 2.5 %

วันที่	กลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน	กลุ่มที่ได้รับวัคซีน
1	2	1
2	2	1
3	1	1
4	1	0
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	0	0
9	0	0
10	0	0
อัตราการตาย	0.6	0.3

<u>ค่าประสิทธิภาพของวัคซีน (RPS)</u>

$$RPS = 1 - \frac{\text{อัตราการตายของกลุ่มที่ได้รับวัคซีน}}{\text{อัตราการตายของกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน}} \times 100$$

ดังนั้นค่า $RPS = 1 - \frac{0.3}{0.6} \times 100 = 50.0\ \%$

ตารางภาคผนวกที่ ค72 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการแช่ภายหลังจากได้รับวัคซีนเป็นเวลา 30 วันโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 2.5 %

NO.	µg protein	mg protein/sample(200µl)	unit/min	unit/min/mg protein
1	20.497	0.0409	28	684.59
2	19.53	0.0390	41.5	1064.10
3	111.10	0.222	123.5	556.30
4	17.918	0.0358	23	642.45
5	73.376	0.1467	95	647.58
6	34.36	0.0687	52	756.90
7	20.819	0.0416	15	360.57

$\bar{x}$ = 673.21 ± 213.28

ตารางภาคผนวกที่ ค73 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ไม่ได้รับวัคซีน(กลุ่มควบคุม)หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

NO.	µg protein	mg protein/sample(200µl)	unit/min	unit/min/mg protein
1	58.54	0.1170	98	837.6
2	88.85	0.1777	91	512.05
3	35.00	0.070	46.75	596.42
4	59.511	0.119	68	571.42
5	1.151	0.002	0.5	250
6	14.048	0.028	15	535.71
7	37.586	0.075	45	600

$\bar{x}$ = 557.60 ± 172.75

ตารางภาคผนวกที่ ค74 ค่า SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการแช่ภายหลังจากได้รับวัคซีนเป็นเวลา 30 วันโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 2.5 %

ตัวที่	ค่าเฉลี่ย OD.ของทรีตเม้นต์ - blank	ค่าเฉลี่ย OD.ของกลุ่ม control - blank	OD.ทรีตเม้นท์ - control
1	0.096	0.051	0.045
2	0.0736	0.0335	0.0401
3	0.0835	0.0645	0.019
4	0.105	0.0475	0.0575
5	0.0665	0.038	0.0285
6	0.0890	0.028	0.061
7	0.076	0.0245	0.0515

$\bar{x} = 0.043 \pm 0.015$ * blank = 0.078

ตารางภาคผนวกที่ ค75 ค่า SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ไม่ได้รับวัคซีน(กลุ่มควบคุม)หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

ตัวที่	ค่าเฉลี่ย OD.ของทรีตเม้นต์ - blank	ค่าเฉลี่ย OD.ของกลุ่ม control - blank	OD.ทรีตเม้นท์ - control
1	0.018	0.001	0.017
2	0.0485	0.035	0.0135
3	0.0845	0.05	0.0345
4	0.053	0.039	0.014
5	0.0635	0.047	0.0165
6	0.0435	0.021	0.0225
7	0.063	0.0415	0.0215

$\bar{x} = 0.0199 \pm 0.007$ * blank = 0.078

ตารางภาคผนวกที่ ค76 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีแช่โดยใช้วัคซีนเข้มข้น 2.5%ภายหลังจากแช่อาหารผสมวัคซีน30วัน (จำนวนเชื้อเรืองแสงเริ่มต้นที่ฉีดคือ 10.75×10^{6} CFU/ml)

NO.	CFU/20 µl	CFU/ml
1	10	500
2	27.5	1375
3	2.5	175
4	9	450
5	1.5	75
6	3	150
7	0.5	25
8	6	300

$\overline{X} = 0.239 \times 10^{3} \pm 0.183 \times 10^{3}$

ตารางภาคผนวกที่ ค77 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งทดลองกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน (กลุ่มควบคุม) ภายหลังจากแช่วัคซีนเป็นเวลา 30 วัน

NO.	CFU/20 µl	CFU/ml
1	16.5	825
2	7.5	375
3	2.5	125
4	1	50
5	22.5	1125
6	164	8200
7	11	550
8	6.5	325

$\overline{X} = 0.482 \times 10^{3} \pm 0.384 \times 10^{3}$

ตารางภาคผนวกที่ ค78 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBSของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีแช่โดยใช้วัคซีนเข้มข้น 2.5%หลังจากได้รับวัคซีน 30วัน

NO.	CFU/20 µl	CFU/ml
1	2.5	125
2	0	0
3	1	50
4	1	50
5	0	0
6	0.5	25
7	0.5	25
8	1	50

$\bar{X}= 0.0285x10^{3} \pm 0.022x10^{3}$

ตารางภาคผนวกที่ ค79 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBS ของกุ้งทดลองกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน(กลุ่มควบคุม)ภายหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

NO.	CFU/20 µl	CFU/ml
1	1.5	75
2	6	300
3	0	0
4	0	0
*5	4.5	225
6	12	600
7	2	100
8	2.5	125

$\bar{X}= 0.117x10^{3} \pm 0.111x10^{3}$

ตารางภาคผนวกที่ ค80 จำนวนกุ้งที่ตายภายหลังจากฉีดเชื้อของกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่แช่วัคซีน หลังจากได้รับวัคซีนเป็นเวลา 30 วันโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 2.5 %

วันที่	กลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน	กลุ่มที่ได้รับวัคซีน
1	2	1
2	1	1
3	1	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	0	0
9	0	0
10	0	0
อัตราการตาย	0.4	0.2

ค่าประสิทธิภาพของวัคซีน (RPS)

$$RPS = 1 - \frac{\text{อัตราการตายของกลุ่มที่ได้รับวัคซีน}}{\text{อัตราการตายของกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน}} \times 100$$

ดังนั้นค่า $RPS = 1 - \frac{0.2}{0.4} \times 100 = 50\ \%$

ตารางภาคผนวกที่ ค81 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการฉีดภายหลังจากได้รับวัคซีนเป็นเวลา 10 วันโดยฉีดวัคซีนเข้มข้น 0.1 %

NO.	µg protein	mg protein/sample(200µl)	unit/min	unit/min/mg protein
1	31.40	0.0628	10	159.235
2	54.876	0.1097	13.5	123.063
3	14.683	0.0293	4	136.51
4	27.384	0.0547	25.75	470.75
5	25.616	0.0512	8	156.25
6	55.841	0.1116	26.5	237.455
7	56.163	0.1123	16	142.475
8	25.294	0.0505	17	336.10
9	42.98	0.0859	10	116.41
10	41.7	0.0834	10	119.90

$\bar{x}$ = 199.76 ± 117.16

ตารางภาคผนวกที่ ค82 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการฉีดภายหลังจากได้รับวัคซีนเป็นเวลา 10 วันโดยฉีดวัคซีนเข้มข้น 0.25 %

NO.	µg protein	mg protein/sample(200µl)	unit/min	unit/min/mg protein
1	19.50	0.039	10	333.33
2	46.677	0.0933	21	225.08
3	64.523	0.1290	20	155.038
4	56.645	0.1133	7.5	66.196
5	20.15	0.0403	3.5	86.85
6	37.15	0.0741	8	107.962
7	47.642	0.0953	20	209.863
8	57.77	0.1155	25.5	220.780
9	44.908	0.0898	16.5	183.74
10	36.227	0.0724	14	193.37

$\bar{x}$ = 178.22 ± 78.66

ตารางภาคผนวกที่ ค83 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ไม่ได้รับวัคซีน หลังจากการฉีดน้ำเกลือ 0.85%เป็นเวลา 10 วัน

NO.	µg protein	mg protein/sample(200µl)	unit/min	unit/min/mg protein
1	84.69	0.169	30.5	180.47
2	49.76	0.099	6.5	65.65
3	65.28	0.130	14.5	111.53
4	43.06	0.086	22	255.81
5	87.16	0.174	28	160.9
6	50.47	0.100	22	220
7	62.11	0.124	26	209.67
8	71.64	0.143	33.5	234.26
9	62.46	0.124	14.5	116.93
10	36.710	0.0734	14	190.5

$\bar{x}$ = 174.57 $\pm$ 60.64

ตารางภาคผนวกที่ ค84 ค่า SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการฉีดภายหลังจากได้รับวัคซีนเป็นเวลา 10 วันโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.1 %

ตัวที่	ค่าเฉลี่ย OD.ของทรีตเม้นต์ - blank	ค่าเฉลี่ย OD.ของกลุ่ม control - blank	OD.ทรีตเม้นท์ - control*
1	0.1085	0.0205	88
2	0.0935	0.021	72.5
3	0.1305	0.0365	94
4	0.097	0.033	64
5	0.093	0.0195	73.5
6	0.116	0.020	96
7	0.0945	0.034	60.5
8	0.1065	0.026	80.5
9	0.0965	0.016	80.5
10	0.1085	0.0295	79

$\bar{x}$ = 78.85 $\pm$ 11.73 blank = 0.084

ตารางภาคผนวกที่ ค85 ค่า SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการฉีดภายหลังจากได้รับวัคซีนเป็นเวลา 10 วันโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.25 %

ตัวที่	ค่าเฉลี่ย OD.ของทรีตเม้นต์ - blank	ค่าเฉลี่ย OD.ของกลุ่ม control - blank	OD.ทรีตเม้นท์ - control*
1	0.0835	0.033	50.5
2	0.1085	0.0315	77
3	0.130	0.0185	111.5
4	0.0925	0.021	71.5
5	0.125	0.0355	89.5
6	0.137	0.0295	107.5
7	0.094	0.0205	73.5
8	0.1135	0.035	78.5
9	0.0615	0.0145	47
10	0.103	0.0165	86.5

$\bar{x}$ = 79.3 ± 20.98 blank = 0.084

ตารางภาคผนวกที่ ค86 ค่า SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ไม่ได้รับวัคซีน(กลุ่มควบคุม)หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน

ตัวที่	ค่าเฉลี่ย OD.ของทรีตเม้นต์ - blank	ค่าเฉลี่ย OD.ของกลุ่ม control - blank	OD.ทรีตเม้นท์ - control
1	0.0705	0.05	20.5
2	0.0695	0.034	35.5
3	0.042	0.038	4
4	0.0845	0.0465	38
5	0.034	0.0335	5
6	0.015	0.0115	3.5
7	0.0255	0.015	10.5
8	0.0235	0.019	4.5
9	0.103	0.0325	70.5
10	0.0805	0.013	67.5

$\bar{x}$ = 25.95 ± 26.03 blank = 0.084

ตารางภาคผนวกที่ ค87 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีฉีดโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.1%ภายหลังจากได้รับวัคซีน 10วัน (จำนวนเชื้อเรืองแสงเริ่มต้นที่ฉีดคือ 3.05×10^{6} CFU/ml)

NO.	CFU/20 µl	CFU/ml
1	2	100
2	2	100
3	1.5	75
4	4	200
5	1	50
6	2	100
7	2	100
8	2	100
9	2	100
10	2	100

$\bar{X} = 1.02 \times 10^{2} \pm 0.38 \times 10^{2}$

ตารางภาคผนวกที่ ค88 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีฉีดโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.25%ภายหลังจากได้รับวัคซีน 10วัน

NO.	CFU/20 µl	CFU/ml
1	2	100
2	4	200
3	5	250
4	1	50
5	2	100
6	5	250
7	3	150
8	6	300
9	4	200
10	4	200

$\bar{X}= 1.80x10^{2} \pm 0.78x10^{2}$

ตารางภาคผนวกที่ ค89 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งทดลองกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน ภายหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 10วัน

NO.	CFU/20 µl	CFU/ml
1	7	350
2	10	500
3	4	200
4	6	300
5	5	250
6	9	450
7	10	500
8	10	500
9	8.5	425
10	11	550

$\bar{X}= 4.025x10^{2} \pm 1.2x10^{2}$

ตารางภาคผนวกที่ ค90 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBS ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีฉีดโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.1%หลังจากได้รับวัคซีน 10วัน

NO.	CFU/20 µl	CFU/ml
1	1	50
2	0	0
3	1	50
4	1	50
5	1	50
6	1.5	75
7	0	0
8	0	0
9	1.5	75
10	1	50

$\overline{X} = 0.4 \times 10^{2} \pm 0.29 \times 10^{2}$

ตารางภาคผนวกที่ ค91 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBS ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีฉีดโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.25%หลังจากได้รับวัคซีน 10วัน

NO.	CFU/20 µl	CFU/ml
1	1	50
2	1.5	75
3	2	100
4	1	50
5	1.5	75
6	3	150
7	2	100
8	1.5	75
9	2	100
10	1.5	75

$\overline{X} = 0.85 \times 10^{2} \pm 0.293 \times 10^{2}$

ตารางภาคผนวกที่ ค92 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBS ของกุ้งทดลองกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน ภายหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน

NO.	CFU/20 µl	CFU/ml
1	3.5	175
2	5	250
3	3	150
4	5	250
5	3.5	175
6	6	300
7	7	350
8	8.5	425
9	5.5	275
10	6.5	325

$\bar{X} = 2.675 \times 10^{2} \pm 0.866 \times 10^{2}$

ตารางภาคผนวกที่ ค93 จำนวนกุ้งที่ตายภายหลังจากฉีดเชื้อของกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ฉีดวัคซีน 0.1 และ 0.25%หลังจากได้รับวัคซีนเป็นเวลา 10 วัน

วันที่	กลุ่มที่รับวัคซีน 0.1 %	กลุ่มที่รับวัคซีน 0.25 %	กลุ่มควบคุม
1	10	3	3
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	0
6	0	0	0
7	0	0	0
8		0	0
9	0	0	0
10	0	0	0

<u>ค่าประสิทธิภาพของวัคซีน (RPS)</u>

$$RPS = 1 - \frac{\text{อัตราการตายของกลุ่มที่ได้รับวัคซีน}}{\text{อัตราการตายของกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน}} \times 100$$

ดังนั้นค่า RPS ของวัคซีนเข้มข้น 0.1 %= $1 - \frac{0.3}{1} \times 100 = 70\ \%$

ดังนั้นค่า RPS ของวัคซีนเข้มข้น 0.25 %= $1 - \frac{0.3}{1} \times 100 = 70\ \%$

ตารางภาคผนวกที่ ค94 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการฉีดภายหลังจากได้รับวัคซีนเป็นเวลา 20 วันโดยฉีดวัคซีนเข้มข้น 0.1 %

NO.	µg protein	mg protein/sample(200µl)	unit/min	unit/min/mg protein
1	63.584	0.1271	26	204.563
2	56.875	0.1137	22	193.491
3	36.415	0.0728	27	370.879
4	50.838	0.1016	19	187.007
5	59.894	0.1197	27	225.563
6	55.198	0.1103	26	235.720
7	68.950	0.1399	36	257.326
8	29.707	0.0594	16	269.360
9	41.782	0.0835	16	191.616
10	71.633	0.1432	28	195.530

$\bar{x}$ = 233.105 ± 56.36

ตารางภาคผนวกที่ ค95 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการฉีดภายหลังจากได้รับวัคซีนเป็นเวลา 20 วันโดยฉีดวัคซีนเข้มข้น 0.25 %

NO.	µg protein	mg protein/sample(200µl)	unit/min	unit/min/mg protein
1	41.111	0.0822	15	182.481
2	12.60	0.0252	7	277.77
3	34.403	0.0688	32.5	472.38
4	44.801	0.0896	24.5	273.437
5	59.223	0.1184	26.5	223.81
6	35.745	0.0714	13.5	189.075
7	68.950	0.1379	49.5	358.955
8	46.142	0.0922	24	260.303
9	45.136	0.0902	18.5	205.099
10	33.730	0.0674	28	415.430

$\bar{x}$ = 285 ± 99.00

ตารางภาคผนวกที่ ค96 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ไม่ได้รับวัคซีน หลังจากการฉีดน้ำเกลือ 0.85%เป็นเวลา 20 วัน

NO.	µg protein	mg protein/sample(200µl)	unit/min	unit/min/mg protein
1	53.45	0.1069	35	327.408
2	72.52	0.1450	30	206.896
3	25.50	0.0510	13	254.900
4	28.79	0.0575	11	191.038
5	35.04	0.0700	20	285.71
6	37.67	0.07534	12	159.27
7	31.42	0.0628	14.5	230.744
8	44.246	0.0884	9.5	107.35
9	27.80	0.0556	17.5	314.748
10	61.34	0.1226	25	203.915

$\bar{x}$ = 228.198 ± 69.234

ตารางภาคผนวกที่ ค97 ค่า SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการฉีดภายหลังจากได้รับวัคซีนเป็นเวลา 20 วันโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.1 %

ตัวที่	ค่าเฉลี่ย OD.ของทรีตเม้นต์ - blank	ค่าเฉลี่ย OD.ของกลุ่ม control - blank	OD.ทรีตเม้นท์ - control
1	0.0975	0.0195	78
2	0.1135	0.028	85.5
3	0.1285	0.0415	87
4	0.0985	0.016	82.5
5	0.095	0.034	61
6	0.1085	0.033	75.5
7	0.098	0.026	72
8	0.099	0.0235	75.5
9	0.1045	0.0295	75
10	0.1205	0.020	100.5

$\bar{x}$ = 79.25 ± 10.512 blank = 0.084

ตารางภาคผนวกที่ ค98 ค่า SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการฉีดภายหลังจากได้รับวัคซีนเป็นเวลา 20 วันโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.25 %

ตัวที่	ค่าเฉลี่ย OD.ของทรีตเม้นต์ - blank	ค่าเฉลี่ย OD.ของกลุ่ม control - blank	OD.ทรีตเม้นท์ - control
1	0.123	0.034	89
2	0.1125	0.032	80.5
3	0.088	0.0325	55
4	0.0535	0.0135	40
5	0.1005	0.0175	83
6	0.125	0.0365	93.5
7	0.119	0.0315	87.5
8	0.1115	0.042	69.5
9	0.151	0.0365	114.5
10	0.1075	0.0175	90

$\bar{x} = 80.25 \pm 20.96$ blank = 0.084

ตารางภาคผนวกที่ ค99 ค่า SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ไม่ได้รับวัคซีน(กลุ่มควบคุม)หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน

ตัวที่	ค่าเฉลี่ย OD.ของทรีตเม้นต์ - blank	ค่าเฉลี่ย OD.ของกลุ่ม control - blank	OD.ทรีตเม้นท์ - control
1	0.0695	0.056	13.5
2	0.0315	0.018	13.5
3	0.024	0.017	7
4	0.0685	0.265	42
5	0.0305	0.0145	16
6	0.037	0.019	18
7	0.0745	0.0335	41
8	0.04	0.0215	18.5
9	0.03	0.0125	17.5
10	0.0155	0.008	7.5

$\bar{x} = 19.45 \pm 12.293$ blank = 0.084

ตารางภาคผนวกที่ ค100 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีฉีดโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.1%ภายหลังจากได้รับวัคซีน 20วัน (จำนวนเชื้อเรืองแสงเริ่มต้นที่ฉีดคือ 4.2×10^6 CFU/ml)

NO.	CFU/20 µl	CFU/ml
1	2	100
2	7	350
3	10	500
4	6	300
5	2	100
6	3	150
7	2	100
8	4	200
9	6	300
10	4	200

$\bar{X} = 2.30 \times 10^2 \pm 1.32 \times 10^2$

ตารางภาคผนวกที่ ค101 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีฉีดโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.25%ภายหลังจากได้รับวัคซีน 20วัน

NO.	CFU/20 µl	CFU/ml
1	4	200
2	5	250
3	4	200
4	4	200
5	6	300
6	8	400
7	2	100
8	3	150
9	2	100
10	9	450

$\bar{X} = 2.35 \times 10^{2} \pm 1.117 \times 10^{2}$

ตารางภาคผนวกที่ ค102 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งทดลองกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน ภายหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 20วัน

NO.	CFU/20 µl	CFU/ml
1	4	200
2	6	300
3	5	250
4	10	500
5	10	500
6	4	200
7	8	400
8	11	550
9	12	600
10	14	700

$\bar{X} = 4.20 \times 10^{2} \pm 1.76 \times 10^{2}$

ตารางภาคผนวกที่ ค103 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBS ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีฉีดโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.1%หลังจากได้รับวัคซีน 20 วัน

NO.	CFU/20 µl	CFU/ml
1	1	50
2	0	0
3	1	50
4	1	50
5	0	0
6	0	0
7	1	50
8	1	50
9	1.5	75
10	2	100

$\bar{X}= 0.425x10^{2} \pm 0.334x10^{2}$

ตารางภาคผนวกที่ ค104 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBS ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีฉีดโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.25%หลังจากได้รับวัคซีน 20 วัน

NO.	CFU/20 µl	CFU/ml
1	1	50
2	2	100
3	5	250
4	4	200
5	2	100
6	2.5	125
7	1	50
8	1	50
9	1	50
10	2	100

$\bar{X}= 1.075x10^{2} \pm 0.687x10^{2}$

ตารางภาคผนวกที่ ค105 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBS ของกุ้งทดลองกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน ภายหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน

NO.	CFU/20 µl	CFU/ml
1	3.5	175
2	5	250
3	2	100
4	10	500
5	14	700
6	3	150
7	2.5	125
8	3.5	175
9	3	150
10	3	150

$\bar{X} = 2.475 \times 10^{2} \pm 1.95 \times 10^{2}$

ตารางภาคผนวกที่ ค106 จำนวนกุ้งที่ตายภายหลังจากฉีดเชื้อของกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ฉีดวัคซีน 0.1 และ 0.25%หลังจากได้รับวัคซีนเป็นเวลา 20 วัน

วันที่	กลุ่มที่รับวัคซีน 0.1 %	กลุ่มที่รับวัคซีน 0.25 %	กลุ่มควบคุม
1	8	1	1
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	0
6	0	0	0
7	0	0	0
8		0	0
9	0	0	0
10	0	0	0

ค่าประสิทธิภาพของวัคซีน (RPS)

$$RPS = 1 - \frac{\text{อัตราการตายของกลุ่มที่ได้รับวัคซีน}}{\text{อัตราการตายของกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน}} \times 100$$

ดังนั้นค่า RPS ของวัคซีนเข้มข้น 0.1 %= $1 - \frac{0.1}{0.8} \times 100 = 87.5\ \%$

ดังนั้นค่า RPS ของวัคซีนเข้มข้น 0.25 %= $1 - \frac{0.1}{0.8} \times 100 = 87.5\%$

ตารางภาคผนวกที่ ค107 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการฉีดภายหลังจากได้รับวัคซีนเป็นเวลา 30 วันโดยฉีดวัคซีนเข้มข้น 0.1 %

NO.	µg protein	mg protein/sample(200µl)	unit/min	unit/min/mg protein
1	53.034	0.106	38	358.491
2	63.079	0.126	41	325.397
3	16.622	0.033	10	303.030
4	77.519	0.155	49.5	319.355
5	50.523	0.101	30	297.030
6	84.425	0.169	39	230.769
7	49.581	0.099	39.5	398.990
8	30.120	0.06	6.5	108.333
9	71.555	0.143	41.5	290.210
10	52.407	0.105	29	276.190

$\bar{x}$ = 290.78 ± 78.139

ตารางภาคผนวกที่ ค108 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการฉีดภายหลังจากได้รับวัคซีนเป็นเวลา 30 วันโดยฉีดวัคซีนเข้มข้น 0.25 %

NO.	µg protein	mg protein/sample(200µl)	unit/min	unit/min/mg protein
1	63.707	0.127	22.5	177.165
2	47.384	0.095	18	189.474
3	57.429	0.115	48	417.391
4	74.694	0.149	87	538.893
5	69.671	0.139	51	366.906
6	95.411	0.191	52.5	274.869
7	84.111	0.168	75.5	449.405
8	59.312	0.119	25	210.084
9	64.649	0.129	26	201.550
10	71.868	0.144	32.5	225.694

$\bar{x}$ = 305.143 ± 128.504

ตารางภาคผนวกที่ ค109 ค่า PO activity ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ไม่ได้รับวัคซีน หลังจากการฉีดน้ำเกลือ 0.85%เป็นเวลา 30 วัน

NO.	µg protein	mg protein/sample(200µl)	unit/min	unit/min/mg protein
1	38.59	0.7718	11	142.523
2	19.133	0.0382	6	157.068
3	31.689	0.0633	9	142.180
4	55.859	0.111	25	225.225
5	68.101	0.1362	30.5	223.935
6	32.003	0.0640	9	140.625
7	46.128	0.0922	22	238.611
8	42.361	0.0847	20	236.127
9	49.267	0.0985	26	263.959
10	40.164	0.0803	8.5	105.853

$\bar{x}$ = 187.610± 55.216

ตารางภาคผนวกที่ ค110 ค่า SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการฉีดภายหลังจากได้รับวัคซีนเป็นเวลา 30 วันโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.1 %

ตัวที่	ค่าเฉลี่ย OD.ของทรีตเม้นต์ - blank	ค่าเฉลี่ย OD.ของกลุ่ม control - blank	OD.ทรีตเม้นท์ - control
1	0.0765	0.0165	60
2	0.0850	0.0240	61
3	0.0860	0.0100	76
4	0.0710	0.0075	63.5
5	0.0780	0.0105	67.5
6	0.0640	0.0240	40.5
7	0.0800	0.0145	65.5
8	0.0660	0.0210	45
9	0.0720	0.0135	58.5
10	0.0610	0.0120	49

$\bar{x}$ = 58.65 ± 10.88 blank = 0.077

ตารางภาคผนวกที่ ค111 ค่า SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการฉีดภายหลังจากได้รับวัคซีนเป็นเวลา 30 วันโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.25 %

ตัวที่	ค่าเฉลี่ย OD.ของทรีตเม้นต์ - blank	ค่าเฉลี่ย OD.ของกลุ่ม control - blank	OD.ทรีตเม้นท์ - control
1	0.1105	0.0525	58
2	0.1725	0.0685	104
3	0.0960	0.0280	68
4	0.1035	0.0390	64.5
5	0.1070	0.0610	46
6	0.1270	0.0375	89.5
7	0.1035	0.0395	64
8	0.1035	0.0280	75.5
9	0.0845	0.0265	58
10	0.1075	0.0380	69.5

$\bar{x}$ = 69.7 $\pm$ 16.67 blank = 0.094

ตารางภาคผนวกที่ ค112 ค่า SO anion ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ไม่ได้รับวัคซีน(กลุ่มควบคุม)หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

ตัวที่	ค่าเฉลี่ย OD.ของทรีตเม้นต์ - blank	ค่าเฉลี่ย OD.ของกลุ่ม control - blank	OD.ทรีตเม้นท์ - control
1	0.0390	0.0325	6.5
2	0.0725	0.0335	39
3	0.0630	0.0275	35.5
4	0.0540	0.0440	10
5	0.0515	0.0180	33.5
6	0.053	0.0370	16
7	0.0505	0.0420	8.5
8	0.0460	0.0255	20.5
9	0.0645	0.0305	34
10	0.0765	0.0475	32

$\bar{x}$ = 23.55 $\pm$ 12.59 blank = 0.077

ตารางภาคผนวกที่ ค113 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยฉีดโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.1%ภายหลังจากได้รับวัคซีน 30วัน (จำนวนเชื้อเรืองแสงเริ่มต้นที่ฉีดคือ 3.5×10^{6} CFU/ml)

NO.	CFU/20 µl	CFU/ml
1	4	200
2	6	300
3	4	200
4	4	200
5	6	300
6	4	200
7	7	350
8	6	300
9	6	300
10	8	400

$\bar{X} = 2.75 \times 10^{2} \pm 0.716 \times 10^{2}$

ตารางภาคผนวกที่ ค114 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PCA ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีฉีดโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.25%ภายหลังจากได้รับวัคซีน 30วัน

NO.	CFU/20 µl	CFU/ml
1	5.5	275
2	4	200
3	4	200
4	5.5	275
5	6	300
6	4	200
7	3.5	175
8	6	300
9	6.5	325
10	6	300

$\bar{X} = 2.55x10^{2} \pm 0.55x10^{2}$

ตารางภาคผนวกที่ ค115 ผลการนับจำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ของกุ้งทดลองกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีนภายหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

NO.	CFU/20 µl	CFU/ml
1	6	300
2	10	500
3	10	500
4	8	400
5	12	600
6	10	500
7	8	400
8	10	500
9	6	300
10	8	400

$\bar{X} = 4.4x10^{2} \pm 0.966x10^{2}$

ตารางภาคผนวกที่ ค116 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBS ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีฉีดโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.1%หลังจากได้รับวัคซีน 30 วัน

NO.	CFU/20 µl	CFU/ml
1	2	100
2	2	100
3	2	100
4	2	100
5	4	200
6	4	300
7	4	200
8	3	150
9	3	150
10	2	100

$\bar{X}= 1.4x10^{2} \pm 0.459x10^{2}$

ตารางภาคผนวกที่ ค117 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBS ของกุ้งที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีฉีดโดยใช้วัคซีนเข้มข้น 0.25%หลังจากได้รับวัคซีน 30 วัน

NO.	CFU/20 µl	CFU/ml
1	4	200
2	2	100
3	2	200
4	3	150
5	3.5	175
6	2.5	125
7	2	100
8	4	200
9	3	150
10	2.5	125

$\bar{X}= 1.525x10^{2} \pm 0.398x10^{2}$

ตารางภาคผนวกที่ ค118 จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TCBS ของกุ้งทดลองกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน ภายหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

NO.	CFU/20 µl	CFU/ml
1	4.5	225
2	3.5	175
3	3	150
4	5	250
5	10	500
6	8	400
7	7.5	325
8	9	450
9	5	250
10	6	300

$\bar{X} = 3.025 \times 10^{2} \pm 1.16 \times 10^{2}$

ตารางภาคผนวกที่ ค119 จำนวนกุ้งที่ตายภายหลังจากฉีดเชื้อของกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ฉีดวัคซีน 0.1 และ 0.25%หลังจากได้รับวัคซีนเป็นเวลา 30 วัน

วันที่	กลุ่มที่รับวัคซีน 0.1 %	กลุ่มที่รับวัคซีน 0.25 %	กลุ่มควบคุม
1	5	1	1
2	1	1	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	0
6	0	0	0
7	0	0	0
8		0	0
9	0	0	0
10	0	0	0

ค่าประสิทธิภาพของวัคซีน (RPS)

$$RPS = 1 - \frac{\text{อัตราการตายของกลุ่มที่ได้รับวัคซีน}}{\text{อัตราการตายของกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน}} \times 100$$

ดังนั้นค่า RPS ของวัคซีนเข้มข้น 0.1 %= $1 - \frac{0.2}{0.6} \times 100 = 67\ \%$

ดังนั้นค่า RPS ของวัคซีนเข้มข้น 0.25 %= $1 - \frac{0.1}{0.6} \times 100 = 83.33\ \%$

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวสาวิตรี ศิลาเกษ

วัน เดือน ปีเกิด 27 พฤษภาคม 2516

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จ
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ประมง)	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	2537

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับระหว่างการศึกษา)

ทุนผู้มีผลการเรียนดีเด่นของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์